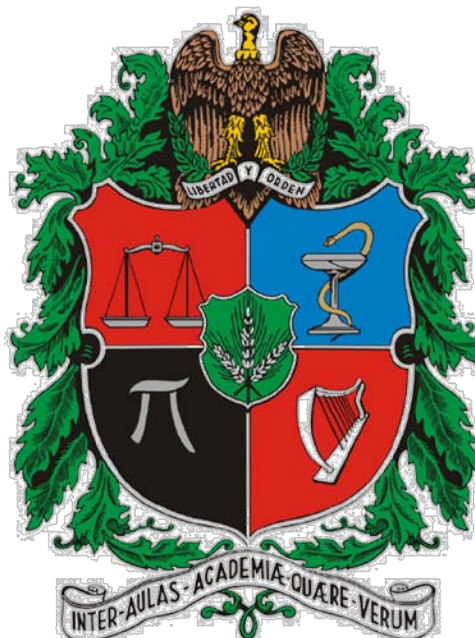


Estudio de la influencia del medio en la reacción de transesterificación de aceites con etanol catalizada por lipasa de *Candida Rugosa*

Ingeniero Químico
OSCAR DARÍO HERNÁNDEZ PARRA

Trabajo de grado para optar al título de:
Magíster en Ingeniería – Ingeniería Química

Dirigido por:
Carlos Eduardo Orrego Alzate, Ph. D.



Universidad Nacional de Colombia – Sede Manizales
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Departamento de Ingeniería Química
Manizales, 2010



ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL MEDIO EN LA REACCIÓN DE
TRANSESTERIFICACIÓN DE ACEITES CON ETANOL CATALIZADA POR
LA LIPASA DE CANDIDA RUGOSA

OSCAR DARÍO HERNÁNDEZ PARRA
Ingeniero Químico

Trabajo presentado para optar al título de:
Magister en Ingeniería – Ingeniería Química

Dirigido por:
Carlos Eduardo Orrego Alzate, Ph.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – SEDE MANIZALES
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
MANIZALES, JULIO DE 2010

*"La interpretación de nuestra realidad con esquemas ajenos sólo contribuye a hacernos
cada vez más desconocidos, cada vez menos libres, cada vez más solitarios"*

*Soledades de América Latina
Discurso de aceptación del Premio Nobel de Literatura, 1982*

Gabriel García Márquez

*A Dios, a mi familia, a mis amigos
y a las dificultades, porque sin ellas la vida sería insípida*

AGRADECIMIENTOS

El autor quiere expresar su agradecimiento a las siguientes entidades por la financiación de este trabajo:

- Universidad Nacional de Colombia – Sede Manizales a través del proyecto “Desarrollo de sistemas catalíticos basados en materiales cerámicos y biopoliméricos para la transformación de aceites vegetales” Código QUIPU 20501005406 financiado mediante la Convocatoria Bicentenario 2009 para proyectos de investigación.
- COLCIENCIAS, por la financiación personal a través del Programa “Jóvenes Investigadores e Innovadores – Año 2009”

También quiero expresar mi sincero agradecimiento a las personas que estuvieron presentes durante el desarrollo de este trabajo haciendo aportes valiosos:

- A mi mamá “Gigi”, y mis hermanos, por su paciencia, comprensión, peleas, buenos momentos, momentos difíciles y todas las experiencias enriquecedoras de una vida llena de buena energía para disfrutar de los prados fértiles y sobrellevar los terrenos áridos. A mis tíos Raúl, Nydia, Gustavo, Hernán, Gladys, a mi abuela Herminda, a todos mis primos porque son el referente de la unión a pesar de las diferencias entre cada persona que constituye una verdadera familia
- A mis una vez compañeros, pero hoy en día grandes amigos John Alexander Posada “Niño” por su persistencia, Jorge Andrés Moncada “May” por su humilde laboriosidad, Jorge Iván Rossero “Mono” por esa acogedora sensación de confraternidad, Luis Eduardo Rincón “Rolo” por su irreverente sensatez, Víctor Manuel Trejos “Viki” y Juan Bernardo Restrepo por su imprudente humor.
- Al grupo de investigación en Alimentos-Frutas por su asesoramiento y acompañamiento, a mi tutor el profesor Carlos Eduardo Orrego, a los ingenieros Natalia Salgado, Juan Diego Mejía y a mi compañera de largas jornadas de trabajo Diana Marcela Cetina, por los buenos momentos, la buena música y su aliento, así como al personal técnico y administrativo de las Plantas Piloto de Biotecnología y Agroindustria por su colaboración.
- Al químico Aristóteles Ortiz de CENICAFÉ, quien me colaboró de manera imprescindible durante la etapa de experimentación con las técnicas cromatográficas empleadas y con un aporte muy valioso en la discusión del trabajo.
- A mis amigos y compañeros de la Alianza Francesa quienes aportaron un escape semanal a todas las preocupaciones y dificultades permitiéndome recargar energías para continuar con el trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	1
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	8
1. RESUMEN	10
2. ABSTRACT	11
3. INTRODUCCIÓN	12
4. MARCO TEÓRICO	16
4.1. Aceites vegetales y biodiesel	16
4.1.1. Aceites vegetales	16
4.1.2. Nociones básicas sobre la química de los aceites	16
4.1.3. Biodiesel	19
4.2. Lipasas	22
4.2.1. El mecanismo catalítico de las lipasas	22
4.2.2. Múltiples estados conformacionales de lipasas y activación interfacial	24
4.2.3. La lipasa de Candida rugosa	24
4.3. Producción convencional de biodiesel	26
4.3.1. Producción catalizada por álcali	26
4.3.2. Producción catalizada por ácido	27
4.4. Producción de biodiesel mediante transesterificación catalizada por lipasas	28
4.4.1. Enzimas en medios orgánicos	28
4.4.2. Necesidad de un solvente para llevar a cabo la transesterificación	28
4.4.3. Antecedentes de estudios cinéticos de la reacción	28
4.5. La actividad termodinámica y el coeficiente de actividad	30
4.5.1. Definiciones generales	30
4.5.2. Estados de referencia en la actividad y el coeficiente de actividad	31
4.5.3. El modelo NRTL	33
4.6. Biocatálisis enzimática en medios no acuosos	34
4.6.1. El uso de enzimas para catálisis en medios no acuosos	34
4.6.2. Evaluación de la influencia del medio de reacción en catálisis enzimática e ingeniería del medio	35
4.6.3. La aproximación TABEK	37

5. HIPÓTESIS.....	38
6. OBJETIVOS.....	38
6.1. Objetivo General.....	38
6.2. Objetivos específicos	38
7. METODOLOGÍA PROPUESTA.....	39
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
8.1. Materiales usados	42
8.2. Análisis de la composición como ácidos grasos para aceite de palma y trioleína grado práctico	44
8.2.1. Equipo de cromatografía de gas con detección por espectrometría de masas (GC/MS)	44
8.2.2. Análisis de aceites y grasas en contenido de ácidos grasos	44
8.3. Equilibración gravimétrica de la lipasa	45
8.4. Montaje experimental de las reacciones de transesterificación	46
8.5. Seguimiento de la reacción de transesterificación por HPLC.....	46
8.5.1. Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	46
8.5.2. Protocolo de análisis de la reacción	47
SECCIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
9. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA “TRIOLEÍNA GRADO PRÁCTICO”	49
10. REPRESENTACIÓN DEL COMPORTAMIENTO TERMODINÁMICO DE LAS SUSTANCIAS DEL SISTEMA.....	50
10.1. Listado de parámetros necesarios para usar NRTL	50
10.2. Datos experimentales y parámetros NRTL obtenidos	50
10.3. Uso de modelos predictivos tipo UNIFAC	52
11. PLANTEAMIENTO DEL MODELO CINÉTICO	61
11.1. Abstracción matemática del mecanismo de acción de las lipasas	61
11.2. Planteamiento de las ecuaciones de la cinética de producción de biodiesel	62
11.3. Desarrollo de la expresión cinética basada en actividades termodinámicas	65
11.3.1. La teoría del estado de transición	65
11.3.2. Cinética enzimática de Michaelis – Menten en términos de actividades	66
11.4. Desarrollo del modelo cinético basado en actividades termodinámicas para la transesterificación de aceite con etanol.....	68
12. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA CINÉTICA DE TRANSESTERIFICACIÓN	75
12.1. Diseño experimental.....	75

12.2. Resultados de las corridas experimentales	75
12.2.1. Variación de los monoglicéridos en el tiempo de reacción	76
12.2.2. Rendimiento de biodiesel	77
12.2.3. Conversión de triglicéridos	78
12.3. Ajuste de los datos experimentales.....	79
12.3.1. Función objetivo y algoritmos de minimización e integración	79
12.3.2. Resultados de los parámetros y variación con la actividad de agua	80
12.3.3. Análisis de los residuales	82
12.4. Predicción y comparación de pruebas usando isooctano como solvente	84
13. CONCLUSIONES	86
14. RECOMENDACIONES.....	88
15. BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXO I. Rutinas computacionales creadas y utilizadas en el trabajo.....	99
ANEXO II. Gráficas de los resultados experimentales de la reacción.....	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Uso de los diferentes tipos de energía en Colombia y el mundo: energía de combustibles fósiles en negro, energía proveniente de fuentes hídricas en azul, energía proveniente de recursos renovables en verde. Adaptado de [1]..... 12
- Figura 2. Proyección de la demanda de biocombustibles en Colombia. (□) Demanda de biodiesel, (△) demanda de etanol. Fuente: figura adaptada de datos publicados en [2]..... 13
- Figura 3. Rendimientos del biodiesel proveniente de diferentes materias primas. a) Rendimiento en la producción, b) Rendimiento energético. Adaptado de [2]. 14
- Figura 4. Molécula de glicerol y nomenclatura de los acilglicéridos. a) Glicerol, b) Estructura plana del glicerol usada como base en la nomenclatura, c) 1-monoglicéridos, d) 2-monoglicéridos, e) 1,2-diglicéridos, f) 1,3-diglicéridos, g) triglicérido simple, h) triglicérido mixto 18
- Figura 5. Rutas de obtención de biodiesel a partir de triglicéridos: a) Hidrólisis y esterificación, b) Transesterificación directa 21
- Figura 6. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de enlaces ésteres por parte de lipasas a partir del mecanismo de reacción de serina proteasas: 1. Enlazamiento del sustrato al sitio activo de la lipasa en la cavidad del oxianión, 2. Formación del primer intermediario tetraédrico, 3. Ataque del ión OH del agua sobre la acil enzima y liberación de la mitad alcohólica del sustrato, 4. Desacilación del complejo acil enzima para reiniciar el ciclo catalítico. Tomado de [15]..... 23
- Figura 7. Representaciones de las estructuras de diferentes lipasas provenientes de *Pseudomonas cepacia* (izq.) y *Candida antarctica* lipasa B (der.). Tomadas de la base de datos Protein Data Bank con entradas 2LIP y 1TCA y dibujadas mediante el software Matlab®..... 24
- Figura 8. Características superficiales de la isoenzima Lip1 de la lipasa de *Candida rugosa* vistas con desde el mismo punto y con la misma orientación: A. Conformación cerrada, B. Conformación abierta. Esquema de color: Los oxígenos cargados se muestran en rojo, los oxígenos polares en magenta, los nitrógenos cargados en azul oscuro, los nitrógenos polares en azul claro y los átomos de azufre en amarillo. Tomada y adaptada de [12]..... 25
- Figura 9. Superposición de una molécula de (inhibidor de la lipasa de *Candida rugosa*) y de una molécula modelo de triglicéridos en una vista cortada de la lipasa Lip1. Los oxígenos del triglicérido están indicados en rojo, la cadena del triglicérido en amarillo y la molécula de inhibidor en azul. Tomado de [12]. 25
- Figura 10. Esquema de producción de biodiesel catalizado por álcali. Adaptado de [24]..... 27
- Figura 11. Esquema de producción de biodiesel catalizado por ácido. Adaptado de [24] 27

Figura 12. Mecanismo de reacción propuesto por Camacho <i>et al</i> [33]: a) Desacilación del triglicérido a través del complejo acil – enzima para producir los diglicéridos, b) Isomerización del 2-monoglicérido a 1(3)-monoglicérido, c) Formación de glicerol del 1(3)-monoglicérido por parte de la lipasa, d) Formación del 1,2-diglicérido del 1(3)-monoglicérido por esterificación del grupo acilo liberado del triglicérido, e) Esterificación del grupo acilo liberado del triglicérido a través del complejo acil – enzima con el alcohol	30
Figura 13. Metodología propuesta para la obtención de parámetros de NRTL para el sistema de transesterificación	39
Figura 14. Metodología propuesta para la obtención de una expresión cinética basada en actividades termodinámicas	40
Figura 15. Metodología usada para la obtención de los parámetros del modelo para los diferentes valores de actividad de agua	41
Figura 16. Metodología de evaluación del modelo cinético con los parámetros obtenidos para la reacción usando isooctano como solvente	41
Figura 17. Equipo de cromatografía de gas con detección por espectrometría de masas utilizado..	44
Figura 18. Montaje para la equilibración de lipasas: Compartimento cerrado de sales, soporte y equilibración (derecha) y medidor de actividad de agua (izquierda).	46
Figura 19. Equipo de cromatografía líquida HPLC usado	47
Figura 20. Datos experimentales de coeficiente de actividad presentados por [88] para una mezcla hexano (1) – trioleína (2). (●) Hexano, (■) Trioleína. En línea continua, datos modelados mediante NRTL, en línea punto–raya para la predicción de UNIFAC con parámetros para acilglicéridos, en línea punteada UNIFAC Dortmund y en línea a trazos la predicción de UNIFAC con parámetros para líquidos.	57
Figura 21. Datos experimentales de coeficientes de actividad presentados por [88] para una mezcla acetona (1) – trioleína (2). (●) Acetona, (■) Trioleína. En línea continua, datos modelados mediante NRTL, en línea punto–raya para la predicción de UNIFAC con parámetros para acilglicéridos, en línea punteada UNIFAC Dortmund y en línea a trazos la predicción de UNIFAC con parámetros para líquidos.....	57
Figura 22. Datos experimentales de coeficiente de actividad presentados por [88] para una mezcla 2–propanol (1) – trioleína (2). (●) 2–Propanol, (■) trioleína. En línea continua, datos modelados mediante NRTL, en línea punto–raya para la predicción de UNIFAC con parámetros para acilglicéridos, en línea punteada UNIFAC Dortmund y en línea a trazos la predicción de UNIFAC con parámetros para líquidos.....	58
Figura 23. Datos experimentales y predicciones del ELL para el sistema trioleína (1) – ácido oleico (2) – etanol (3) a 20°C mediante: a) UNIFAC original, b) UNIFAC – ACEITES y c) UNIFAC	

Dortmund. (▲) Composiciones globales. (■) Datos experimentales de la línea de reparto. (--) Predicciones de líneas de reparto y envolvente de la región de inmiscibilidad. (x) Fracciones máxicas predichas de las fases inmiscibles59

Figura 24. Datos experimentales y predicciones del ELL para el sistema trioleína (1) – ácido oleico (2) – etanol (3) a 30°C mediante: a) UNIFAC original, b) UNIFAC – ACEITES y c) UNIFAC Dortmund. (▲) Composiciones globales. (■) Datos experimentales de la línea de reparto. (--) Predicciones de líneas de reparto y envolvente de la región de inmiscibilidad. (x) Fracciones máxicas predichas de las fases inmiscibles60

Figura 25. Esquema de la reacción de hidrólisis de ésteres mediante lipasas61

Figura 26. Aplicación de la abstracción del mecanismo a una esterificación en medio orgánico....61

Figura 27. Planteamiento del ciclo catalítico en la transesterificación de un acilglicérido con etanol por parte de una lipasa.63

Figura 28. Abstracción del mecanismo de reacción para las tres reacciones globales en la producción de biodiesel a partir del ciclo catalítico planteado.64

Figura 29. Mecanismo de reacción propuesto para la transesterificación enzimática de triglicéridos.65

Figura 30. Simulación del modelo de transesterificación con $\beta = (1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1)^T$ y condiciones iniciales $c_{T0} = 1 \text{ g/mL}$, $c_{A0} = 3 \text{ g/mL}$. (-) Triglicéridos, (- -) diglicéridos, (...) monoglicéridos, (-.) etanol, (+) biodiesel, (x) glicerol73

Figura 31. Simulación del modelo de transesterificación con $\beta = (1 \ 0,03 \ 0,005 \ 0,5 \ 0,3 \ 0,1 \ 0,2 \ 0,1 \ 1,2 \ 0,7 \ 0,8)^T$ y condiciones iniciales $c_{T0} = 1 \text{ g/mL}$, $c_{A0} = 3 \text{ g/mL}$. (-) Triglicéridos, (--) diglicéridos, (...) monoglicéridos, (-.) etanol, (+) biodiesel, (x) glicerol.....73

Figura 32. Seguimiento de la reacción correspondiente a las corridas 2 (derecha) y 5 (izquierda) del diseño experimental. Los datos experimentales se muestran como sigue: (▼) Triglicéridos, (■) diglicéridos, (●) monoglicéridos y (◆) biodiesel.76

Figura 33. Rendimiento de biodiesel a acilglicéridos frente a las concentraciones iniciales de reactivos después de 48 h de reacción. a) $a_w = 0,577$; b) $a_w = 0,753$, c) $a_w = 0,847$. (▼) $c_{A0} = 0,1578 \text{ g/mL}$, (■) $c_{A0} = 0,0631 \text{ g/mL}$, (●) $c_{A0} = 0.0316 \text{ g/mL}$78

Figura 34. Conversión de triglicéridos frente a las concentraciones iniciales de acilglicéridos después de 48 h de reacción. a) $a_w = 0,577$; b) $a_w = 0,753$, c) $a_w = 0,847$. (▼) $c_{A0} = 0,1578 \text{ g/mL}$, (■) $c_{A0} = 0,0631 \text{ g/mL}$, (●) $c_{A0} = 0.0316 \text{ g/mL}$ 79

Figura 35. Variación de los parámetros de la cinética en función de la actividad de agua: a) V_{mT} (▼), V_{mD} (■), V_{mM} (●); b) K_T (▼), K_D (■), K_M (●); c) v_T (▼), v_D (■), v_M (●); d) K_A (+), K_I (x).....81

Figura 36. Valor absoluto de la media de los residuales para el diseño experimental vs las concentraciones iniciales de los reactivos y los productos: a) $a_w = 0,577$; b) $a_w = 0,753$, c) $a_w = 0,847$ 83

Figura 37. Datos experimentales y datos predichos por el modelo para la reacción con isooctano como solvente replicando las condiciones de la corrida 12 del diseño experimental. Los datos experimentales se muestra como sigue: (▼) Triglicéridos, (■) diglicéridos, (●) monoglicéridos y (◆) biodiesel. Las predicciones del modelo se trazaron mediante líneas: (-) Triglicéridos, (--) diglicéridos, (·-) monoglicéridos y (-·) biodiesel.85

Figura 38. Datos experimentales y datos predichos por el modelo para la reacción con isooctano como solvente replicando las condiciones de la corrida 23 del diseño experimental. Los datos experimentales se muestra como sigue: (▼) Triglicéridos, (■) diglicéridos, (●) monoglicéridos y (◆) biodiesel. Las predicciones del modelo se trazaron mediante líneas: (-) Triglicéridos, (--) diglicéridos, (·-) monoglicéridos y (-·) biodiesel.85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas de producción de biodiesel instaladas en el país. Adaptada de [1]	15
Tabla 2. Ácidos grasos comunes y su nomenclatura. Adaptado de [4, 6].....	17
Tabla 3. Composición característica de aceites vegetales y grasas en términos de ácidos grasos. Adaptado de [7]	19
Tabla 4. Revisión de algunas transesterificaciones de aceites llevadas a cabo por lipasas	29
Tabla 5. Sales utilizadas para la equilibración, preparación y valor de actividad de agua [73]	45
Tabla 6. Resultados del análisis GC/MS y composición de materia prima y Aceite de palma RBD	49
Tabla 7. Resultados del análisis por HPLC de los aceites analizados.....	49
Tabla 8. Parámetros de NRTL necesarios para la descripción termodinámica.....	50
Tabla 9. Recopilación de datos con modelos termodinámicos usados para evaluar el coeficiente de actividad termodinámica de aceites vegetales y sustancias relacionadas a la producción de biodiesel	51
Tabla 10. Parámetros extraídos de la literatura de ELL de aceites con alto contenido en C18:1	51
Tabla 11. Parámetros obtenidos de la base de datos de Aspen Plus®	52
Tabla 12. Parámetros de NRTL estimados a partir de los datos presentados en [88]. Solvente (1) – Trioleína (2)	52
Tabla 13. División de las moléculas de los componentes usados en este trabajo mediante UNIFAC original [89].....	55
Tabla 14. División de las moléculas de los componentes usados en este trabajo mediante UNIFAC adaptado para sistemas grasos [78].....	55
Tabla 15. División de las moléculas de los componentes usados en este trabajo mediante UNIFAC Dortmund [91]	56
Tabla 16. Niveles de los factores y correspondientes concentraciones iniciales de sustratos	75
Tabla 17. Diseño experimental usado en la transesterificación	76
Tabla 18. Prueba de hipótesis sobre la variación de la concentración de monoglicéridos con un nivel de significancia de 5%.....	77

Tabla 19. Parámetros regresados e intervalos de confianza al 95%.....	80
Tabla 20. Prueba de la hipótesis de distribución normal de los residuales del modelo con 5 % de nivel de significancia	82
Tabla 21. Prueba de hipótesis con 5% de significancia sobre la media de los residuales para cada valor de a_w	83
Tabla 22. Conversión y rendimiento de la reacción con n-hexano e isooctano como solventes	84

1. RESUMEN

En este trabajo se planteó un análisis de la influencia del medio de reacción en la transesterificación de aceites con etanol para la producción de biodiesel por medio de una lipasa proveniente del hongo *Candida rugosa* usando una aproximación cinética. Se evaluaron dos parámetros del medio de reacción: la actividad de agua y el solvente utilizado. Esto se hizo modificando una aproximación conocida como TABEK (*Thermodynamic Activity Based Enzyme Kinetics*). Esta aproximación consiste en utilizar actividades termodinámicas en vez de concentraciones para los mecanismos de reacción, de tal manera que las fuerzas guías de la reacción no están dadas solo por la presencia de los reactivos y/o productos, sino también por las interacciones que ellos poseen. Estas interacciones son caracterizadas por el comportamiento termodinámico de las sustancias involucradas y que permite evaluar el efecto que tiene un componente presente pero no reaccionante como un solvente. Para este efecto, inicialmente se estudió la capacidad de un modelo termodinámico de correlacionar datos de comportamiento termodinámico normalmente ligados a las actividades termodinámicas o el coeficiente de actividad. Se evaluó la posibilidad de utilizar un modelo molecular no predictivo (NRTL) para ajustar este comportamiento sin tener éxito gracias a la falta de datos experimentales en este sentido y la dificultad de obtenerlos para algunas de las sustancias de la reacción. Así entonces se evaluaron dos modelos predictivos, UNIFAC y UNIFAC Dortmund con diferentes datos encontrados en la literatura. Entre estos se seleccionó el modelo UNIFAC con unos parámetros adecuados para acilglicéridos.

Posteriormente se planteó el mecanismo de acción de la transesterificación. Se presentaron las mismas deducciones de las ecuaciones para el modelo de Michaelis - Menten que permitió resaltar las suposiciones más importantes al incluir las actividades termodinámicas y, a partir del mecanismo propuesto y estas suposiciones se presentó un modelo matemático de la cinética de reacción. Este modelo fue acompañado de unas pruebas experimentales con diferentes actividades de agua con las que se hizo un ajuste de los parámetros del modelo que permitió una evaluación de su comportamiento con la actividad de agua. Finalmente, el modelo y sus parámetros ajustados fueron utilizados para predecir el resultado de una corrida en isooctano y para comparar los resultados. El modelo describió bien los resultados cinéticos de la transesterificación de un aceite problema (trioleína) con etanol en un medio de hexano. El modelo logró predecir el comportamiento en isooctano.

2. ABSTRACT

In this work it is purposed an analysis of the influence of the reaction medium on the transesterification of oils with ethanol for production of biodiesel catalyzed by a lipase from the fungus *Candida rugosa* using a kinetic approach. Two parameters from the reaction medium were evaluated: water activity and the solvent used. This was carried out following an approach known as TABEK (*Thermodynamic Activity Based Enzyme Kinetics*). This approach consists on the use of thermodynamic activities instead of concentration for the development of reaction mechanisms, such that the driving forces are not only determined by the presence of reactants and/or products, but also for the interactions between them. These interactions are characterized by the thermodynamic behavior and allow to assess the effect of the presence of a component which is not a reactant, like a solvent. In this sense, the ability of a thermodynamic model to correlate data of thermodynamic behavior usually related to thermodynamic activities of activity coefficients was evaluated. The possibility of using a non - predictive molecular model (NRTL) to fit this behavior was unsuccessful since not enough experimental data were found and technical difficulties arose for some substances involved in the reaction. Instead, two predictive models UNIFAC and UNIFAC Dortmund were evaluated using different data found in the open literature. Among these models, a special UNIFAC was selected, whose parameters are specially obtained for acylglycerols.

After that, a mechanism for the transesterification was purposed. As a starting point, the equations were developed for Michaelis - Menten mechanism in order to identify the most important assumptions required when the thermodynamic activities are introduced. Then, a mathematical model was derived using the assumptions identified previously. A set of experimental runs of the reaction were carried out and the results were used to adjust the final parameters in the model, and this allowed an evaluation of their behavior with water activity. Finally, the model and its fitted parameters were used to predict the results of a couple of runs in isooctane. The model described well the results on the transesterification of an oil (triolein) with ethanol in hexane, and also the model was capable of predict the behavior in isooctane.

3. INTRODUCCIÓN

Hoy en día en el mundo existe un gran interés por el desarrollo de combustibles provenientes de fuentes renovables (biocombustibles, energía eólica, solar, celdas de combustibles, etc.) como alternativa a la utilización de combustibles fósiles, no solo gracias a su cantidad limitada y en constante declive, su impacto en el ambiente, sino también a los problemas resultantes del contexto político y económico de los países donde se encuentran los principales yacimientos.

Colombia no es ajena a este problema, y en cuanto a la dependencia de combustibles de fuentes no renovables, según datos del Ministerio de Minas y Energía [1], la canasta energética de Colombia está altamente concentrada en el uso de estas (85,80%), aunque también es importante la energía proveniente de fuentes hídricas (13%) y sólo un pequeño 1,20% de la energía proviene de recursos renovables no convencionales (Figura 1). La situación del país frente a la dependencia de fuentes no renovables es similar a la situación mundial, pero en el marco de la región vemos una clara desventaja que hace al país susceptible a los problemas mencionados.

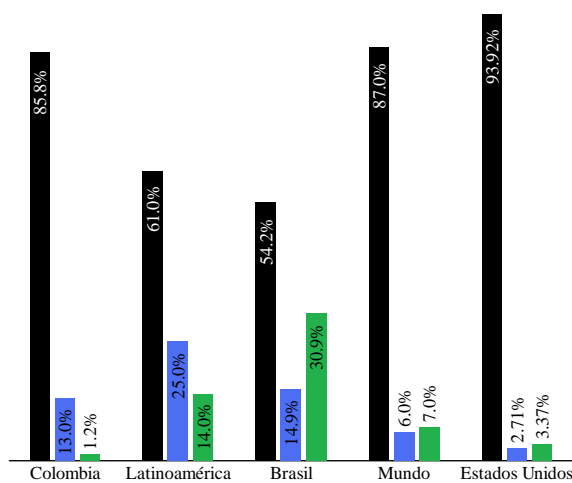


Figura 1. Uso de los diferentes tipos de energía en Colombia y el mundo: energía de combustibles fósiles en negro, energía proveniente de fuentes hídricas en azul, energía proveniente de recursos renovables en verde. Adaptado de [1]

En vista de estas situaciones el gobierno nacional ha estimulado el desarrollo de procesos de producción y uso de combustibles de fuentes renovables no convencionales apuntando en dos direcciones: la producción de etanol a partir de cultivos ricos en azúcares (caña, remolacha, etc.), materiales celulósicos y lignocelulósicos (maderas, bagazo, etc.), y la producción de biodiesel a partir de aceites y grasas de origen animal y vegetal. Esto se ha llevado a cabo mediante el impulso de leyes que exigen la adición de estos biocombustibles a los combustibles derivados del petróleo en una proporción pequeña, que va aumentando en el tiempo (Ley 693 de 2001, Ley 939 de 2004), leyes que otorgan exenciones tributarias a su comercialización (Ley 788 de 2002, Ley 939 de 2004), estímulos a la implementación de zonas francas para proyectos agroindustriales (Decreto 383 de 2007) e incentivos a la inversión (reformas tributarias, programas ICR – Incentivo a la Capitalización Rural y AIS – Agro Ingreso Seguro), así como el establecimiento de requisitos técnicos, ambientales y regulaciones de precios, acopio y distribución de los mismos (Resoluciones

447 de 2003, 1565 de 2004, 1289 de 2005, 18-2087 de 2007 y 18-1232 de 2008 entre otros, de los Ministerios del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y de Minas y Energía).

A partir de estas resoluciones legales y con las expectativas de crecimiento del parque automotor colombiano, el gobierno nacional también estima que la demanda de biocombustibles para consumo interno irá en aumento en los próximos años como se muestra en la Figura 2. Se puede observar que si bien la demanda de alcohol y la de biodiesel aumentan, esta última crecerá más rápido, incluso sobrepasando para 2019 al doble con respecto a la producción de alcohol carburante, lo que hace indicar una ingente necesidad de establecer nuevas plantas de producción para la demanda requerida.

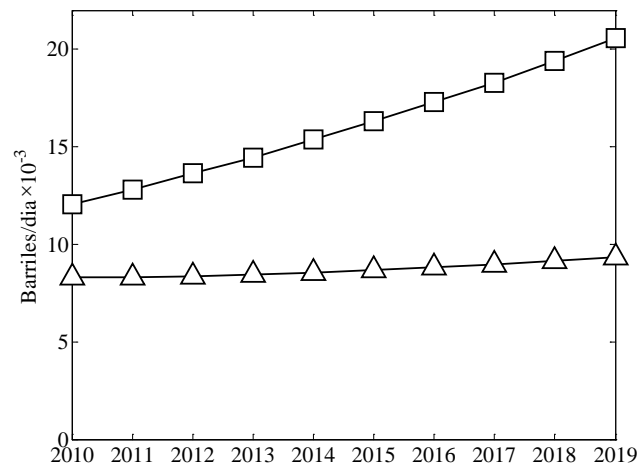


Figura 2. Proyección de la demanda de biocombustibles en Colombia. (□) Demanda de biodiesel, (△) demanda de etanol. Fuente: figura adaptada de datos publicados en [2]

En cuanto a las posibles materias primas en la producción de biodiesel, Colombia cuenta con una gran diversidad de climas que permiten tener una gran variedad de cultivos oleaginosos con hasta varias cosechas por año, de tal manera que la discusión se centra en el rendimiento de biodiesel que estas puedan ofrecer. En la Figura 3 se muestran algunos resultados considerados por el Ministerio de Minas y Energía [2]. En particular, el aceite de palma presenta altos rendimientos de biodiesel por hectárea cultivada por año y rendimientos energéticos altos frente a otras materias primas, sin embargo, no es la única materia prima que se considera en los proyectos de desarrollo de biodiesel, aunque si es la más importante. Otros cultivos considerados para posterior desarrollo son la *Jathropha* y la higuera [1].

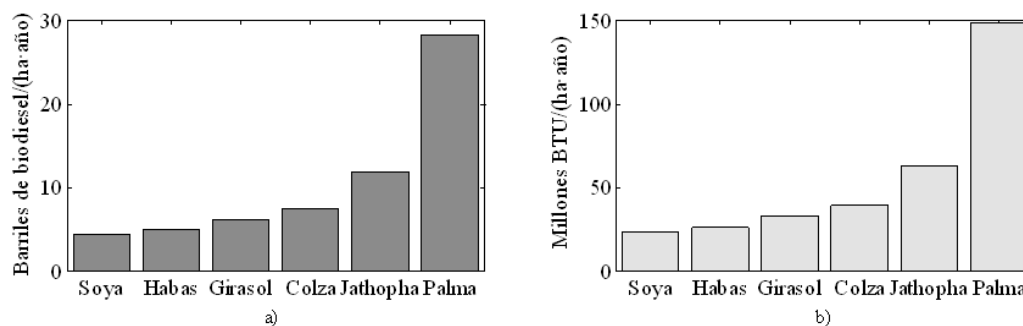


Figura 3. Rendimientos del biodiesel proveniente de diferentes materias primas. a) Rendimiento en la producción, b) Rendimiento energético. Adaptado de [2].

Otra consideración tiene que ver con el alcohol utilizado y su calidad. En el mundo es muy común usar metanol como la materia prima para la fabricación de biodiesel por la alta disponibilidad del mismo, sin embargo, el metanol tiene la desventaja de provenir normalmente de fuentes no renovables, en particular de origen fósil. El etanol, en cambio, puede obtenerse de fuentes renovables como ya se mencionó.

En la actualidad el país tiene en funcionamiento siete plantas de producción de biodiesel cuyo total de producción estimado para 2009 es de 516.000 ton/año (ver Tabla 1). , lo cual indica que el estímulo del gobierno nacional ha surtido efecto. Sin embargo, los procesos establecidos normalmente tienen algunas desventajas a considerar. El proceso de producción de biodiesel puede ser llevado a cabo usando tecnologías diferentes, diferenciadas en mayor medida por el catalizador utilizado, aunque industrialmente lo usual es usar una catálisis alcalina mediante la preparación previa de un alcóxido, generalmente a partir de NaOH o en menor medida KOH, con el alcohol con el que se quiera transesterificar. El uso de la catálisis alcalina conlleva un riesgo en el proceso, la posibilidad de saponificación de las grasas o aceites que sirven de materia prima, en particular si estas grasas o aceites contienen altas proporciones de ácidos grasos libres, algo común en los aceites vegetales crudos. De esta manera, se hace evidente la necesidad de purificación de las grasas o aceites utilizados con el fin de minimizar la producción de jabón, esto aumenta los costos de proceso y dificulta la separación de grasas y alcoholes que no reaccionan, así como del subproducto natural del proceso, la glicerina.

Una tecnología prometedora por sus múltiples ventajas comparativas es la tecnología enzimática mediante lipasas, que son capaces de llevar a cabo la reacción. Las lipasas soslayan una buena cantidad de los efectos adversos del proceso convencional, además de ofrecer tecnologías más limpias en cuanto a residuos, pueden usar aceites y grasas crudas, no pueden llevar a cabo una saponificación ni otras reacciones secundarias, toleran la presencia de agua y funcionan en condiciones suaves de temperatura y presión, además en estado inmovilizado permiten una separación rápida [3]. Sin embargo, estas tecnologías no han sido suficientemente estudiadas para permitir explotar todo su potencial. Es por estos motivos que este trabajo se centra en el estudio de los principales efectos en la reacción catalizada por lipasas.

Tabla 1. Plantas de producción de biodiesel instaladas en el país. Adaptada de [1]

Ubicación	Inversionista	Producción (ton / año)	Área requerida (ha)	Empleos	Inicio de operación
Codazzi, Cesar	Oleoflores S.A.	50.000	11.111	3.000	Nov – 2007
Santa Marta, Magdalena	Odin Energy Santa Marta Corp	36.000	8.000	2.160	Ago – 2008
Santa Marta, Magdalena	Biocombustibles Sostenibles del Caribe S.A.	100.000	22.222	6.000	Feb – 2009
Facatativá, Cundinamarca	Bio D S.A.	100.000	22.222	6.000	Feb – 2009
Barrancabermeja, Santander	Ecodiesel de Colombia S.A.	100.000	22.222	6.000	Mar – 2009
Carlos de Guaroa, Meta	Aceites Manuelita S.A.	100.000	22.222	6.000	Mar – 2009
Santa Marta, Magdalena	Clean Energy	30.000	7.000	1.800	Mayo – 2009

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Aceites vegetales y biodiesel

4.1.1. Aceites vegetales

Los aceites vegetales son sustancias normalmente extraídas de diferentes semillas de plantas cuyo contenido graso es importante, son bastante versátiles en cuanto a sus aplicaciones, aunque los usos más conocidos son en la industria alimentaria y en la producción de jabón, también son útiles en la fabricación de productos cosméticos, lubricantes, aislamientos térmicos, etc. Generalmente su extracción se realiza mediante dos tipos de métodos, extracciones mecánicas y extracciones con solvente [4]. Las extracciones mecánicas normalmente se realizan sometiendo las semillas a una fuerte compresión mediante prensas que obligan al aceite a salir de la estructura de las semillas que los contienen, mientras que las extracciones por solvente, regularmente se realizan mediante el contacto con solventes derivados de petróleo, en los que se solubilizan muy bien. Los aceites crudos (recién extraídos) por ambas vías contienen rastros de otros tipos de sustancias que se encuentran naturalmente en las semillas, por ejemplo, pigmentos, vitaminas, esteroides, tocoferoles, fosfolípidos, ácidos grasos, etc. [4]. Adicionalmente, una particularidad importante en la industria oleoquímica es el olor característico que para muchas aplicaciones no es deseable. Esto crea una necesidad de unidades de refinamiento y, por consiguiente da lugar a una clasificación correspondiente a los procesos que se realizan con ellos. Los pasos para el tratamiento normalmente incluyen un pretratamiento, una desacidificación, blanqueamiento y desodorización [4].

4.1.2. Nociones básicas sobre la química de los aceites

Es muy común encontrar una caracterización de los aceites vegetales y las grasas de acuerdo con un contenido de ácidos grasos, sin embargo, esto no quiere decir que estos aceites o grasas estén compuestos por ellos aunque exista una pequeña cantidad de ellos llamada *ácidos grasos libres* (FFA por las siglas en inglés de *free fatty acids*), de hecho, los aceites vegetales y las grasas están compuestos principalmente de *triacilglicéridos* (comúnmente llamados *triglicéridos*), que son ésteres triples de ácidos grasos con glicerol, de tal manera que en muchos casos esta útil caracterización no permite dimensionar una real composición de los aceites y grasas. Por este motivo, es necesario entrar a revisar la nomenclatura de las sustancias relacionadas, ácidos grasos y acilglicéridos, para una mejor comprensión de las sustancias con las que se relaciona este trabajo.

Las moléculas de ácidos grasos presentes en los aceites vegetales y grasas son cadenas de ácidos carboxílicos usualmente sin ramificaciones que pueden estar totalmente saturadas o tener dobles enlaces en algunos sitios de la cadena. Los ácidos grasos saturados son fácilmente nombrados e identificados, sin embargo, la presencia de insaturaciones en la cadena da origen a isómeros de algunos ácidos grasos según la configuración *cis* y *trans* que contengan en su estructura. Ambos isómeros pueden resultar importantes gracias a que, si bien en la naturaleza se suelen presentar los ácidos grasos insaturados con configuraciones *cis*, los tratamientos térmicos [5] o pretratamientos

de los aceites crudos pueden isomerizar estos ácidos hacia los isómeros *trans* que son termodinámicamente más favorables [6].

Existen entonces diferentes maneras de denominar los ácidos grasos y diferenciar las posibles especies moleculares de los mismos: la nomenclatura de las sustancias según las reglas de la IUPAC, algunos nombres comunes que existen para ciertos ácidos, una nomenclatura numérica, e incluso es común asignar letras para ciertos ácidos grasos que se usan en mayor medida para la nomenclatura de acilglicéridos. En la Tabla 2 se presentan algunos de los ácidos grasos saturados más importantes y presentes en los aceites vegetales.

Tabla 2. Ácidos grasos comunes y su nomenclatura. Adaptado de [4, 6]

Tipo	Nomenclatura IUPAC	Nombre común	Nomenclatura numérica	Letra
Saturados	Ácido butanoico	Butírico	4:0	B
	Ácido pentanoico	Valérico	5:0	-
	Ácido hexanoico	Caproico	6:0	H
	Ácido octanoico	Caprílico	8:0	Oc
	Ácido decanoico	Cáprico	10:0	D
	Ácido dodecanoico	Láurico	12:0	La
	Ácido tetradecanoico	Mirístico	14:0	M
	Ácido hexadecanoico	Palmitico	16:0	P
	Ácido heptadecanoico	Margárico	17:0	-
	Ácido octadecanoico	Estearico	18:0	S
	Ácido eicosanoico	Araquídico	20:0	Ad
	Ácido docosanoico	Behénico	22:0	-
	Ácido tetracosanoico	Lignocérico	24:0	-
Insaturados	Ácido 9- <i>cis</i> -hexadecenoico	Palmitoleico	16:1 ω 7, 16:1(n-7), 16:1 Δ 9	Po
	Ácido 9- <i>cis</i> -octadecenoico	Oleico	18:1 ω 9, 18:1(n-9), 18:1 Δ 9	O
	Ácido 9- <i>trans</i> -octadecenoico	Elaidico	18:1 <i>trans</i> 9	-
	Ácido <i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico	Linoleico	18:2 ω 6, 18:2(n-6)	L
	Ácido 12-hidroxi-9- <i>cis</i> -octadecenoico	Ricinoleico	-	-
	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	α -Linolénico	18:3 ω 3, 18:3(n-3)	Ln
	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	γ -Linolénico	18:3 ω 3, 18:3(n-3)	-
	Ácido <i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	Araquidónico	20:4 ω 6	An

En la nomenclatura numérica se acostumbra agrupar dos números que indican el número de carbonos de la cadena y el número de insaturaciones en ella. Adicionalmente, como estas insaturaciones presentes son usualmente causa de reactividad que causan malos olores en los productos o signos de degradación bioquímica, se complementa la nomenclatura numérica con las letras “omega”, “delta”, o “n - x” para denotar la localización de estas insaturaciones. Cuando se usa la letra omega se añade el número del carbono donde se encuentra la primera insaturación contando a partir del grupo metilo que se encuentra más alejado del grupo carboxílico. De igual manera, si se añade la forma “n-”, se añade el número del carbono de la insaturación siguiendo las instrucciones para “omega”. Si se añade delta, se adjunta el carbono donde se encuentra la insaturación contando a partir del carbono adyacente al ácido carboxílico [4, 6]. Así por ejemplo, el ácido oleico (ácido 9-octadecenoico) se denomina (18:1 ω 9).

En términos de los acilglicéridos se debe considerar a la molécula de glicerol que es la base de su formación (Figura 4). Ésta es originalmente una molécula simétrica, pero cuando se esterifica uno de los grupos hidroxilo primarios o ambos por distintos ácidos, el carbono central adquiere un carácter quiral imponiendo una distinción entre estereoisómeros de los acilglicéridos posibles [6]. Para tal fin se reglamentó una nomenclatura especial para denotar las tres posiciones disponibles para esterificación en la molécula, tomando como referencia una proyección plana, precedida del prefijo *sn*-. En la Figura 4a y b se ven la estructura de la molécula de glicerol y su proyección plana con las posiciones indicadas. Cuando se esterifica un grupo hidroxilo se obtienen los *monoacilglicéridos* o *monoglicéridos*, y debido a la simetría de la molécula se pueden tener dos tipos: 1- (o α -) monoglicéridos (*sn*-1 y *sn*-3) y los 2- (o β -) monoglicéridos en los que rigurosamente se debe indicar la posición estereoespecífica en la que se encuentra unido el ácido graso.

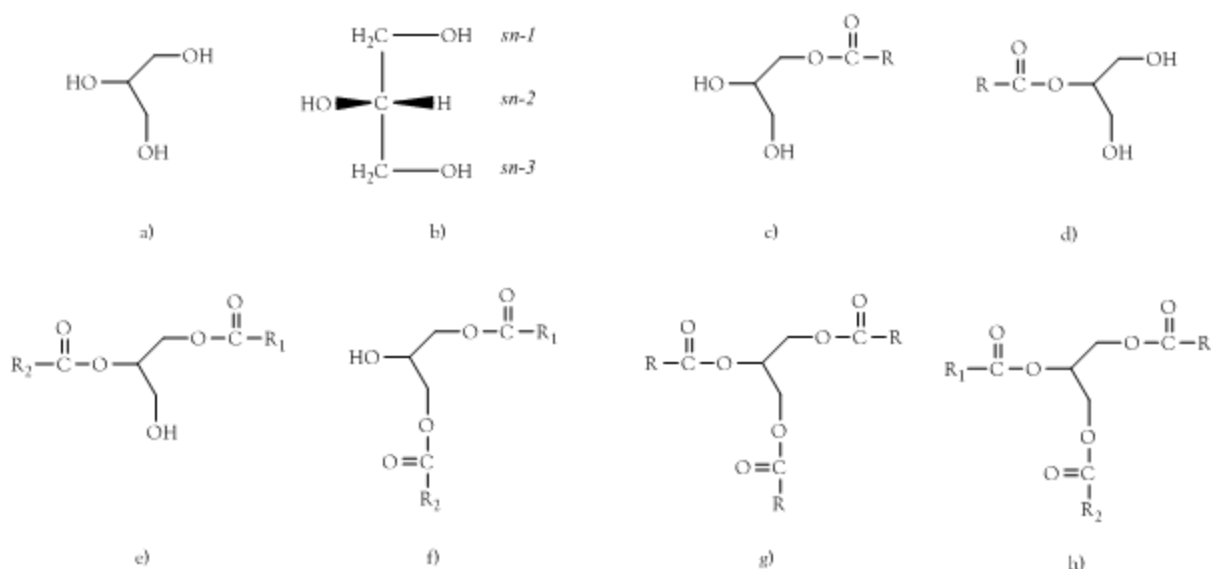


Figura 4. Molécula de glicerol y nomenclatura de los acilglicéridos. a) Glicerol, b) Estructura plana del glicerol usada como base en la nomenclatura, c) 1-monoglicéridos, d) 2-monoglicéridos, e) 1,2-diglicéridos, f) 1,3-diglicéridos, g) triglicérido simple, h) triglicérido mixto

En el caso de esterificar dos grupos hidroxilos se obtienen los *diacilglicéridos* o *diglicéridos* que, de nuevo gracias a la simetría de la molécula pueden ser de dos tipos: 1,2-diglicéridos y 1,3-diglicéridos. Para los triacilglicéridos, principales componentes de las grasas, normalmente se distinguen dos tipos característicos, los triglicéridos simples, aquellos en donde los tres grupos son esterificados por ácidos del mismo tipo, y los triglicéridos mixtos, en donde en dos posiciones se esterifican dos ácidos diferentes [4]. Con los triglicéridos es muy común encontrar abreviaciones de los nombres utilizando las letras y los prefijos *sn*-, *rac*- y β - indicando el uso del orden estereoespecífico para identificar donde se ubica cada ácido graso, una mezcla racémica entre los dos posibles triglicéridos intercambiando las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, y una mezcla de proporción desconocida de los ácidos intercambiando las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, respectivamente [6].

Como se mencionó antes, la principal estrategia de análisis de la composición de aceites vegetales es expresar el contenido en ácidos grasos, que consta principalmente en la conversión de los triglicéridos en metil ésteres o etil ésteres de los ácidos grasos que son relativamente sencillos de

analizar (ver sección 8.2). Una composición típica para algunos aceites vegetales se presenta en la Tabla 3. Existen diferentes propuestas sobre cómo calcular la distribución de estos ácidos entre sus triglicéridos, sin embargo, se puede observar algunas características generales para los aceites vegetales, por ejemplo, los ácidos grasos insaturados se localizan preferentemente en la posición $sn-2$, particularmente esto sucede con el ácido linoleico, y casi siempre los ácidos grasos saturados se hallan en las posiciones $sn-1$ y $sn-3$ [6].

Tabla 3. Composición característica de aceites vegetales y grasas en términos de ácidos grasos. Adaptado de [7]

Ácido graso		Aceite							
		Maíz	Semilla de algodón	Maní	Semilla de colza	Soya	Girasol	Palma	Coco
Láurico	(12:0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	46,50
Mirístico	(14:0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	19,20
Palmítico	(16:0)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	42,80	9,80
Palmitoleico	(16:1 ω 7)	11,67	28,33	11,38	3,49	11,75	6,08	0,00	0,00
Estearico	(18:0)	1,85	0,89	2,39	0,85	3,15	3,26	4,50	3,00
Oleico	(18:1 ω 9)	25,16	13,27	48,28	64,40	23,26	16,93	40,50	6,90
Linoleico	(18:2 ω 6)	60,60	57,51	31,95	22,30	55,53	73,73	10,10	2,20
Linolénico	(18:3 ω 3)	0,48	0,00	0,93	8,23	6,31	0,00	0,20	0,00
Araquídico	(20:0)	0,24	0,00	1,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Behénico	(22:0)	0,00	0,00	2,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lignocérico	(24:0)	0,00	0,00	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

4.1.3. Biodiesel

El inminente descenso en la cantidad disponible de combustibles fósiles, así como algunas preocupaciones en cuanto al efecto ambiental de su utilización, han impulsado recientemente la búsqueda de sustitutos a partir de materias primas renovables que permitan los mismos usos que aquellos de origen fósil tienen, en especial en su rol de productor de energía, aunque también como materia prima para la fabricación de diferentes sustancias que parten de estos. No obstante, la idea de usar aceites vegetales, que son materias primas renovables, como fuente de energía no es nueva, tanto que en la Exposición Universal de París de 1900, Rudolf Diesel presentó su hoy célebre motor usando aceite de maní como combustible, con el fin de ofrecerle al gobierno francés una posibilidad de abastecimiento independiente de energía en sus colonias, e incluso años después, varios gobiernos europeos seguirían esta misma idea [8]. Esto convierte a los aceites vegetales en el primer “biodiesel”. Sin embargo, el desarrollo de los procesos de extracción y refinamiento adecuados del petróleo crudo y sus múltiples aplicaciones opacaron en su momento la idea original de usar aceites como la fuente primaria de energía, e impulsaron el surgimiento del diesel como combustible por excelencia, de paso adaptando el desarrollo de motores y maquinaria basados en este combustible.

Durante algunas crisis y casos de emergencia, varios países y empresas han buscado alternativas nuevamente en los aceites vegetales como sustitutos totales o parciales del diesel convencional. Por ejemplo, en China durante la Segunda Guerra Mundial se experimentó con el craqueo de aceites vegetales para obtener sustancias que sirvieran como un reemplazo del combustible fósil [8], o en 1980 gracias a un embargo petrolero sobre Suráfrica, la empresa Caterpillar Brazil utilizó mezclas

de diesel con hasta un 10% de aceites vegetales para mantener la potencia de los motores de su maquinaria sin ajustarlos [7]. No fue práctico sustituir al diesel con 100% aceites vegetales, pero una mezcla 20% aceite y 80% diesel fue muy satisfactoria.

Actualmente varias razones empezaron a despertar nuevamente interés en el desarrollo de alternativas de largo plazo a los combustibles fósiles basados en aceites vegetales, principalmente en el sector automovilístico: las preocupaciones ambientales alrededor de la carga de CO₂ que se lanza a la atmósfera junto con otros contaminantes que impulsaron regulaciones de los gobiernos, la inestabilidad política en los países productores y su consiguiente volatilidad en los precios del combustible, el desarrollo y optimización de la producción de aceites a partir de varias plantas oleaginosas y algas con altos rendimientos, y la necesidad de mejorar el mercado agrícola en algunos países, inicialmente europeos y norteamericanos y ahora extendidos a otros países con vocación agrícola [8].

En este sentido, cabe aclarar que los aceites vegetales también son fuente de otro tipo de “biodiesel”, más comúnmente llamado *diesel renovable* o *aceite vegetal hidrotratado*, que se fabrica por una hidrodeshidrogenación de éstos en presencia de hidrógeno y un catalizador, y que, gracias a la presencia de cadenas de ácidos que solo en muy raras ocasiones están ramificados, consta de alcanos lineales incluyendo de manera importante compuestos como el hexadecano, más comúnmente denominado *cetano*, que es la referencia de mayor calidad en el “índice de cetano” usado para evaluar los combustibles convencionales [8]. Y como se mencionó antes, la pirolisis o craqueo térmico en atmósferas de aire o nitrógeno de los triglicéridos produce compuestos como alquenos, alcadienos, aromáticos y otros con los que se puede producir sustitutos de la gasolina y productos con características similares al diesel convencional (baja viscosidad, alto índice de cetano, contenidos aceptables de azufre, agua y sedimentos), sin embargo es inaceptable en términos de cenizas, residuos de carbón y punto de niebla [7]. A pesar de la similitud de los productos anteriores con el diesel convencional, fueron los procesos de transesterificación, desarrollados a principios de la década de 1940, como resultado de la búsqueda de un método más simple para extraer glicerina durante la producción de jabón para elaborar explosivos durante la guerra, los que se impondrían como los convencionales en la producción de biodiesel [9].

Actualmente se denomina *biodiesel* a los ésteres que se forman con ácidos grasos y alcoholes de cadena corta. Estos se producen de aceites vegetales pero tienen mejores propiedades como combustibles que los aceites. Por ejemplo, una mezcla de metil éster de ácidos grasos provenientes de aceite de palma con el diesel convencional aumenta la potencia de un motor convencional, reduce sus emisiones de NO_x porque reduce la temperatura de combustión y lleva a cabo una combustión completa, mejora la resistencia a los efectos generados por la corrosión y por lo tanto reduce la emisión de particulados como Al, Ca, Fe o Zn [10].

Los ésteres que conforman el biodiesel pueden ser obtenidos de los triglicéridos de los aceites mediante dos rutas: una hidrólisis seguida de la esterificación con el alcohol (o simultáneamente) y una transesterificación directa como se muestra en la Figura 5.

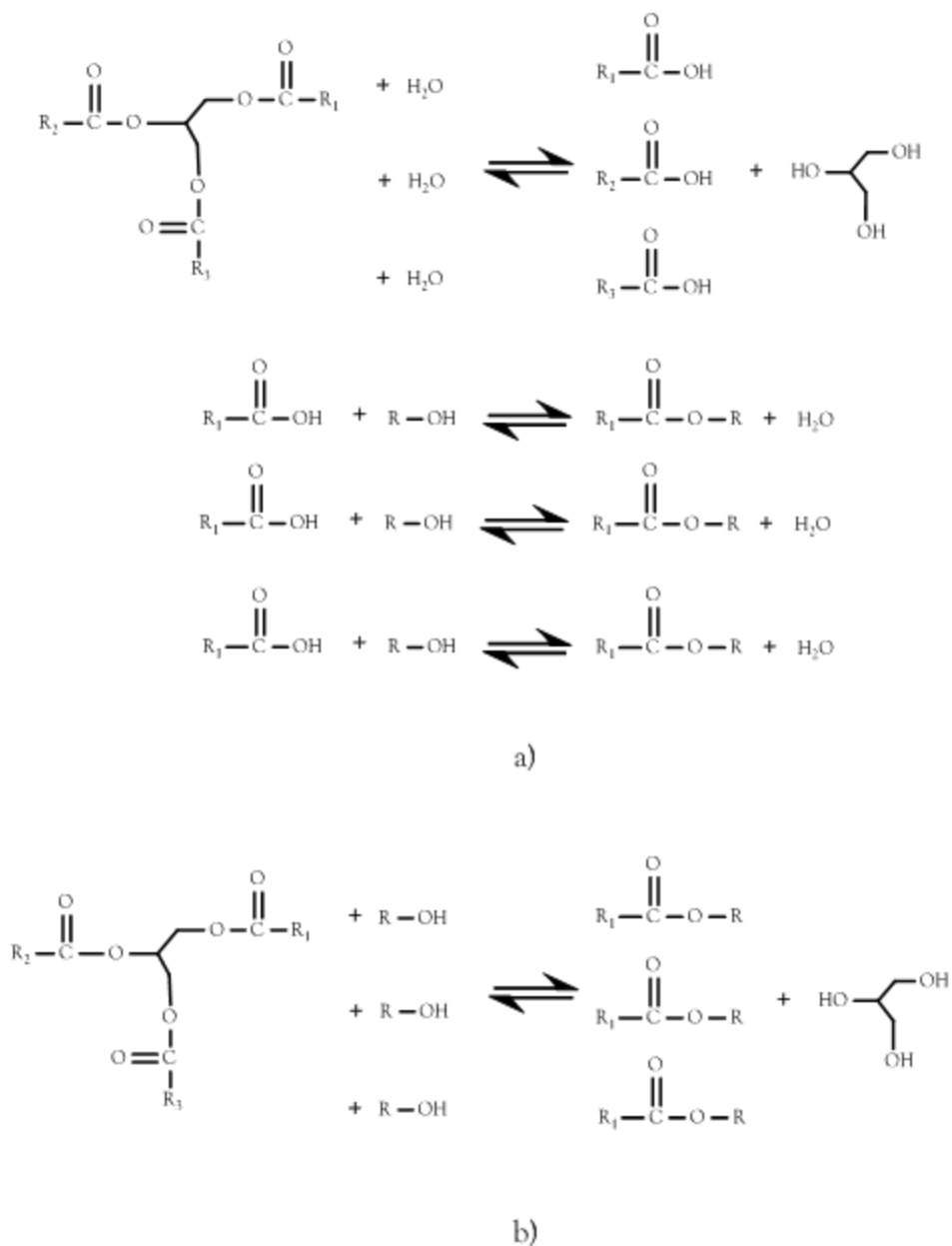


Figura 5. Rutas de obtención de biodiesel a partir de triglicéridos: a) Hidrólisis y esterificación, b) Transesterificación directa

El mecanismo en ambas vías incluye una degradación paulatina de los triglicéridos produciendo diglicéridos y monoglicéridos que también siguen degradándose hasta glicerol, esto hace al seguimiento de las reacciones con aceites algo bastante complejo, ya que el número de sustancias involucradas resulta difícil de manejar. Para dar un ejemplo sencillo, suponiendo que se realiza una transesterificación del triglicérido trioleína con etanol, se presenta el problema de seguir la aparición y desaparición de 1,2-dioleína, 1,3-dioleína, 1-monooleína, 2-monooleína, oleato de etilo, glicerol y etanol. Por esta razón, en varias aplicaciones de transesterificación para producir biodiesel se realizan ajustes de tal manera que se puedan cuantificar acilglicéridos específicos o grupos de sustancias completos como tri-, di- y monoglicéridos, además de biodiesel.

4.2. Lipasas

Las lipasas son enzimas que en la naturaleza degradan los triglicéridos durante la digestión de alimentos que contienen aceites o grasas, y además son útiles para la fabricación de enlaces ésteres sintéticos aromáticos, alifáticos y otros en medios no-acuosos. Se encuentran en animales, plantas y microorganismos, y son probablemente los biocatalizadores con un uso más extendido debido a las particulares propiedades de ellas (por ejemplo, porque pueden ofrecer, bien sea altos rendimientos o un amplio espectro de sustratos, o por el contrario, estereo- y regioselectividad hacia compuestos ópticamente puros, etc., según el requerimiento). Constan de entre 270 y 641 aminoácidos, tienen pesos moleculares que oscilan entre 20 y 60 kDa [11-12], y están definidas como triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3) capaces de hidrolizar preferentemente los radicales de ácidos grasos de cadena larga en los triglicéridos, tomando al trioleoilglicerol como estándar para definir a una cadena larga, para diferenciarlas de otras carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) que preferentemente hidrolizan ésteres de ácidos grasos de cadena corta, aunque algunas lipasas también logran hacerlo [11, 13-14], y de acilglicerolesterasas (EC 3.1.1.23) que preferentemente actúan sobre mono- o diglicéridos.

Las primeras estructuras 3D de las lipasas dilucidadas provinieron de la lipasa pancreática humana y la lipasa de *Rhizomucor miehei* usando cristalografía de rayos X, y a partir de allí, un gran número de lipasas microbianas, animales y humanas han sido estudiadas y dilucidadas, lo que permitió reconocer características estructurales comunes a este grupo que permiten indicar los factores que afectan su estereo- y regioselectividad [15]. En general las lipasas tienen un patrón de plegado de α/β -hidrolasa con una triada catalítica que consiste de un residuo de serina nucleofílica, un aspartato o glutamato que está unido por un puente de hidrógeno a una histidina. Normalmente, salvo algunas excepciones [14], esta serina está ubicada en un pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly, que colabora en la estabilización del complejo enzima-sustrato. Adicionalmente, algunas de sus estructuras normalmente cuentan con compartimentos que le permiten enlazarse a los triglicéridos: una cavidad que forma un oxianión y tres compartimentos para acomodar los ácidos grasos que se encuentren en las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3, tal que las diferencias que tienen en el tamaño y la hidrofiliidad o hidrofobicidad de estos compartimentos determinan la especificidad (o si no tiene alguna) de la correspondiente lipasa [11].

4.2.1. El mecanismo catalítico de las lipasas

En la literatura revisada no se encontró un estudio basado en la observación de las estructuras tridimensionales de los complejos entre lipasas y triglicéridos o demás complejos planteados en el mecanismo catalítico en la transesterificación de triglicéridos. Sin embargo, como la triada catalítica de las lipasas consiste de Ser-His-Asp/Glu, se cree que el mecanismo catalítico de las lipasas es similar al de las serina-proteasas. En este aspecto, se han planteado mecanismos para la hidrólisis de enlaces éster siguiendo el mecanismo de las serina-proteasas [15].

La hidrólisis empezaría (ver Figura 6) con un ataque por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono del grupo carbonilo del éster del lípido susceptible de ser hidrolizado. Se forma un intermediario tetraedro caracterizado por la carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, y que además es estabilizado por hélices de la estructura de la

lipasa y puentes de hidrógeno entre los grupos NH de residuos adyacentes formando lo que se denomina “la cavidad del oxianión”. Para ayudar a mejorar el ataque nucleofílico de la serina, el residuo de histidina catalítica recibe un protón del grupo hidroxilo de la serina para orientar el anillo imidazol de la misma y neutralizar parcialmente la carga que se desarrolla allí. Este mismo protón pasa al oxígeno del enlace éster que se separa del enlace tetraédrico obteniéndose el primer producto. La mitad acilo del sustrato termina por esterificarse con la serina, creando una enzima acilada. La desacilación comienza con el agua que entra al sitio activo y es activada por la histidina sacando un protón y dejando un ión OH que ataca nuevamente al átomo del grupo carbonilo ahora esterificado con la serina catalítica. De nuevo, un intermediario tetraédrico se forma y se estabiliza por las interacciones en la cavidad de oxianión. La histidina entonces dona el protón al átomo de oxígeno de la serina catalítica, haciendo que se libere el componente acilo. Una vez se libera el ácido formado, la enzima está lista para otro ciclo catalítico [15].

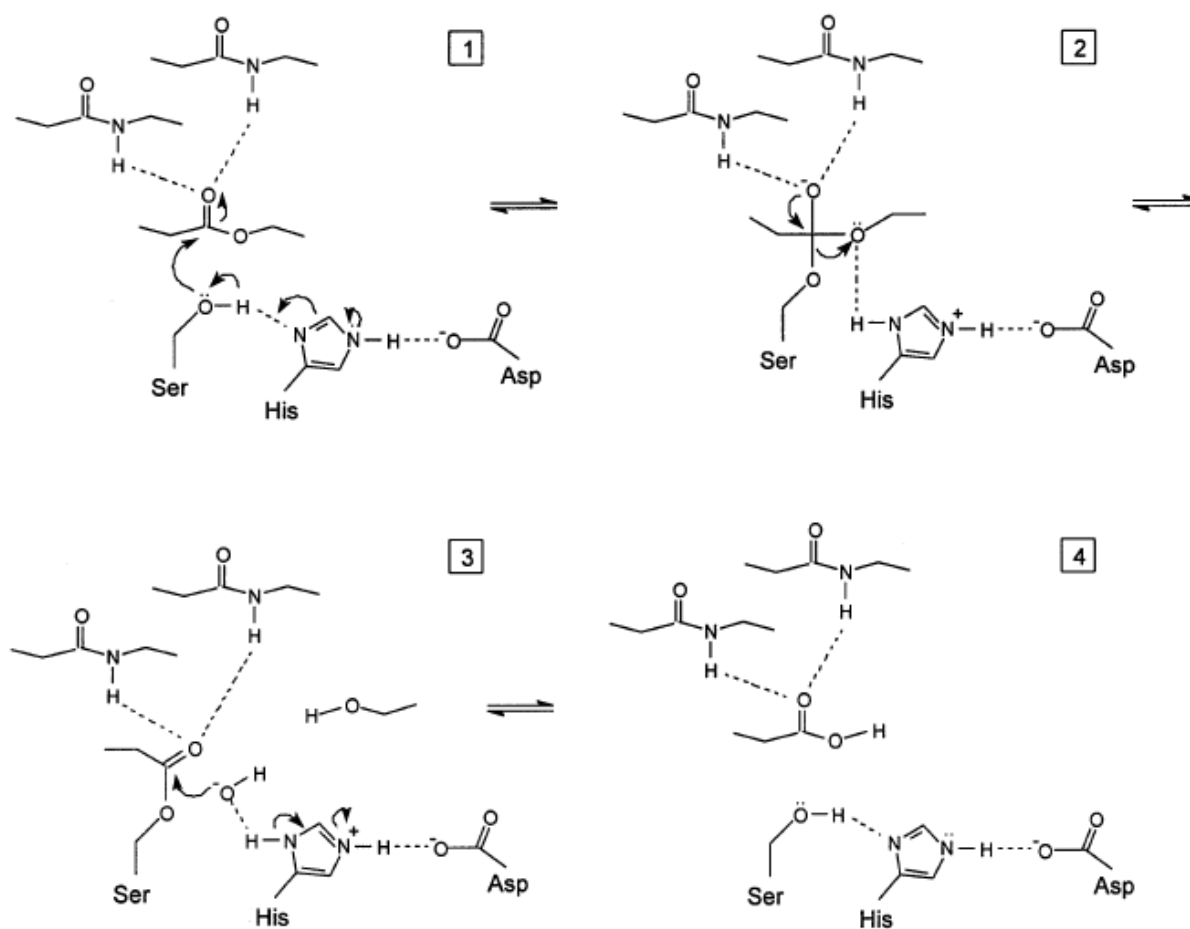


Figura 6. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de enlaces ésteres por parte de lipasas a partir del mecanismo de reacción de serina proteasas: 1. Enlazamiento del sustrato al sitio activo de la lipasa en la cavidad del oxianión, 2. Formación del primer intermediario tetraédrico, 3. Ataque del ión OH del agua sobre la acil enzima y liberación de la mitad alcohólica del sustrato, 4. Desacilación del complejo acil enzima para reiniciar el ciclo catalítico. Tomado de [15]

4.2.2. Múltiples estados conformacionales de lipasas y activación interfacial

Una característica importante de las lipasas es un fenómeno de incremento en la actividad de la enzima cuando actúa en una interfase, en micelas o sustratos que han sido emulsificados o en sustratos concentrados [14-16] y que se han recogido bajo el nombre de *activación interfacial*. Esta característica se ha corroborado con la observación de más de una conformación estable en las estructuras de varias lipasas (ver Figura 7). En presencia de tales interfases, algunos residuos cercanos a los sitios activos sufren una reestructuración exponiendo estos al ambiente de la enzima, y por consiguiente a la presencia de sustratos, lo que aumenta su actividad. En ausencia de tales interfases, estos residuos cercanos esconden el sitio activo, de tal forma que actúan como una “tapa”.

De esta manera, las lipasas tienen dos estructuras estables, una cerrada (inactiva) que se ve favorecida en medios acuosos y una abierta (activa) que se forma en la interfase agua – lípido como se ve en la Figura 8 para la lipasa de *Candida rugosa*.

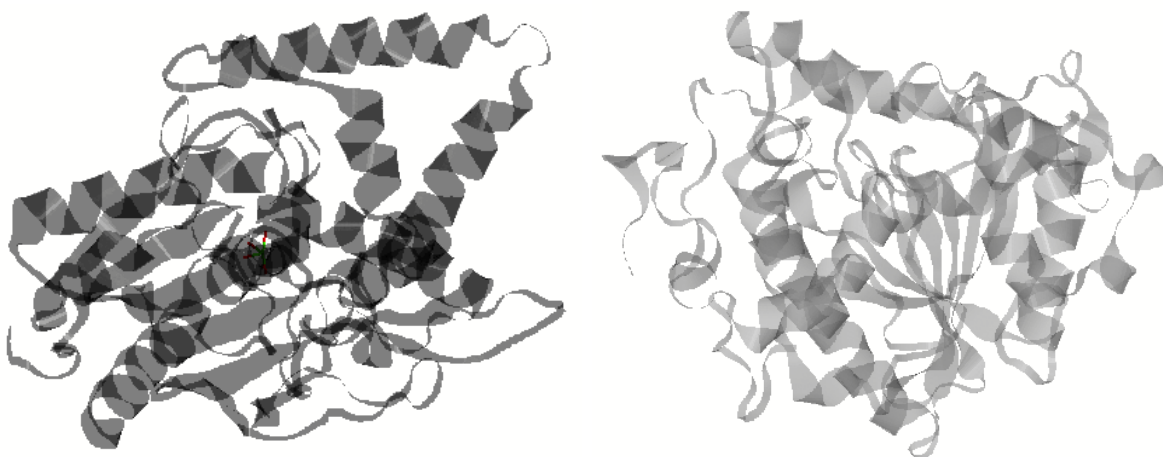


Figura 7. Representaciones de las estructuras de diferentes lipasas provenientes de *Pseudomonas cepacia* (izq.) y *Candida antarctica* lipasa B (der.). Tomadas de la base de datos Protein Data Bank con entradas 2LIP y 1TCA y dibujadas mediante el software Matlab®

4.2.3. La lipasa de *Candida rugosa*

Originalmente, la levadura *Candida rugosa* fue aislada en la década de 1960 a partir de suelos naturales dado que se identificó su alta capacidad de exudar lipasa, y hoy en día es una de las más estudiadas y su uso se ha documentado en un sin número de ejemplos, tanto en una función hidrolítica (mayoritariamente en medios acuosos) como en una función sintética, comúnmente encontrada en medios orgánicos [17].

A escala molecular, la lipasa de *Candida rugosa* no es una única molécula, originalmente se reconocieron y aislaron dos lipasas, denominadas en su momento *Lipasa A* y *Lipasa B*, pero hoy en día se han identificado hasta siete genes capaces de expresar igual número de isoenzimas, y se han denominado (tanto las isoenzimas como los genes que finalmente las expresan) mediante números *Lip1*, *Lip2*,..., *Lip7*. Entre estas isoenzimas, las estructuras de *Lip1*, *Lip2* y *Lip3* han sido

plenamente identificadas, su secuencia de aminoácidos ha sido resuelta, e incluso sus estructuras 3D ya han sido observadas mediante cristalografía de rayos X y se encuentran depositadas en el banco de datos de acceso público *Protein Data Bank*. Todas las isoenzimas tienen 534 aminoácidos y una gran similitud entre sus secuencias de aminoácidos, todas presentan el patrón de plegado de α/β -hidrolasa, y todas menos Lip4 presentan una “tapa” que como se indicó antes, cubre el sitio activo y permite el fenómeno de activación interfacial [17].

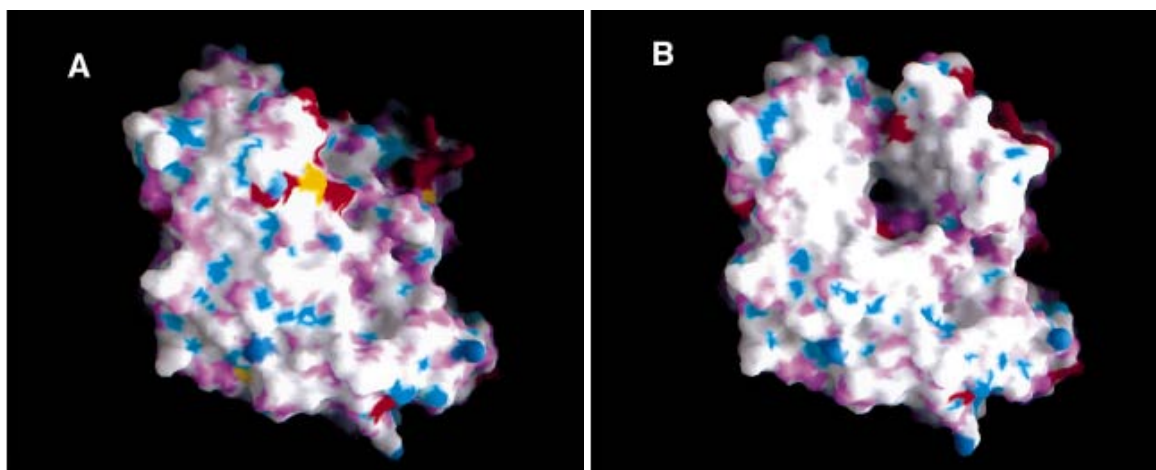


Figura 8. Características superficiales de la isoenzima Lip1 de la lipasa de *Candida rugosa* vistas con desde el mismo punto y con la misma orientación: A. Conformación cerrada, B. Conformación abierta. Esquema de color: Los oxígenos cargados se muestran en rojo, los oxígenos polares en magenta, los nitrógenos cargados en azul oscuro, los nitrógenos polares en azul claro y los átomos de azufre en amarillo. Tomada y adaptada de [12].

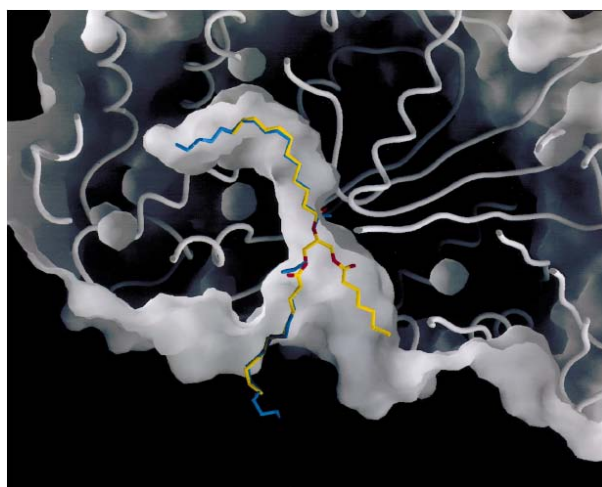


Figura 9. Superposición de una molécula de (inhibidor de la lipasa de *Candida rugosa*) y de una molécula modelo de triglicéridos en un una vista cortada de la lipasa Lip1. Los oxígenos del triglicérido están indicados en rojo, la cadena del triglicérido en amarillo y la molécula de inhibidor en azul. Tomado de [12].

Las isoenzimas Lip1, Lip2 y Lip3 han mostrado diferentes propiedades catalíticas. Por ejemplo, Lip1 tiene una mayor afinidad hacia sustratos no ramificados y de cadenas largas [18], particularmente triglicéridos en donde muestra una gran afinidad para cadenas de ocho y diez carbonos, así como para ácido oleico [19] (un comportamiento más parecido a lipasa), mientras que Lip2 y Lip3 tienen mayor favorabilidad a ésteres más pequeños o con efectos estéricos [18-19],

y en particular Lip3 presenta mayor actividad a la hidrólisis de ésteres de *p*-nitrofenol con ácidos grasos, e incluso se le ha descrito a Lip3 como una colesterol esterasa [20].

En las preparaciones comerciales de lipasa de *Candida rugosa* generalmente se encuentran las isoenzimas Lip1, Lip2 y Lip3, casi siempre con una mayor proporción de Lip1, alrededor del 80%, de tal manera que esta ha sido la más estudiada. Para esta isoenzima se ha develado la estructura 3D tanto en su conformación abierta [21], como cerrada [22] revelando la existencia de la tapa que resulta en la activación interfacial (ver Figura 8).

Por otro lado, las estructuras obtenidas con diferentes inhibidores similares a cadenas de ácidos grasos en ellas permiten dilucidar que no existe, a diferencia de lipasas de *Pseudomonas fluorescens* o [13], las lipasas de *Candida rugosa* no presenta “bolsillos” o cavidades en su estructura para contener las cadenas de ácidos que no están siendo esterificados, de tal manera que las otras cadenas en un triglicérido queda por fuera de la estructura de la misma.

4.3. Producción convencional de biodiesel

4.3.1. Producción catalizada por álcali

Este es el proceso convencional de producción de biodiesel, que es el más usado. La principal característica de este proceso es el uso de catalizadores alcalinos en la reacción, tanto homogéneos como heterogéneos regularmente NaOH, aunque también se usan KOH, carbonatos, etc. La reacción mediante este catalizador presenta una desventaja importante frente a otros procesos, y es que, estos tienen la posibilidad de saponificar los triglicéridos, es decir, en vez de realizar la transesterificación se produce una sal sódica de los ácidos grasos (jabón) que trae como consecuencia dificultades enormes en la separación de los productos. También el contenido natural de fosfolípidos de los aceites crudos, proveen la posibilidad de producir lecitina, que actúa como emulsificante, teniendo el mismo efecto del jabón. En particular, una de las mayores dificultades es la acidez presente en los aceites, es decir, el contenido de ácidos grasos libres. Estos son más proclives a la esterificación con el catalizador que con el alcohol, por consiguiente, un aceite con un alto contenido (mayor a 2,5%) debe ser tratado. Normalmente este tratamiento es una transesterificación con un ácido, a la cual éstos responden muy bien, sin embargo, los ácidos usados son ácidos fuertes como el ácido sulfúrico, que presentan problemas de corrosión en los equipos del proceso, toxicidad y problemas ambientales. Este proceso tiene como ventaja una alta conversión de triglicéridos a biodiesel (aproximadamente 95% después de 1 h de reacción [7, 9]). Otras desventajas incluyen la necesidad de muchas unidades de refinamiento, ya que no se tolera la presencia de otras sustancias como pigmentos, ni tampoco de agua [23]. Un esquema común del proceso se muestra en la Figura 10.

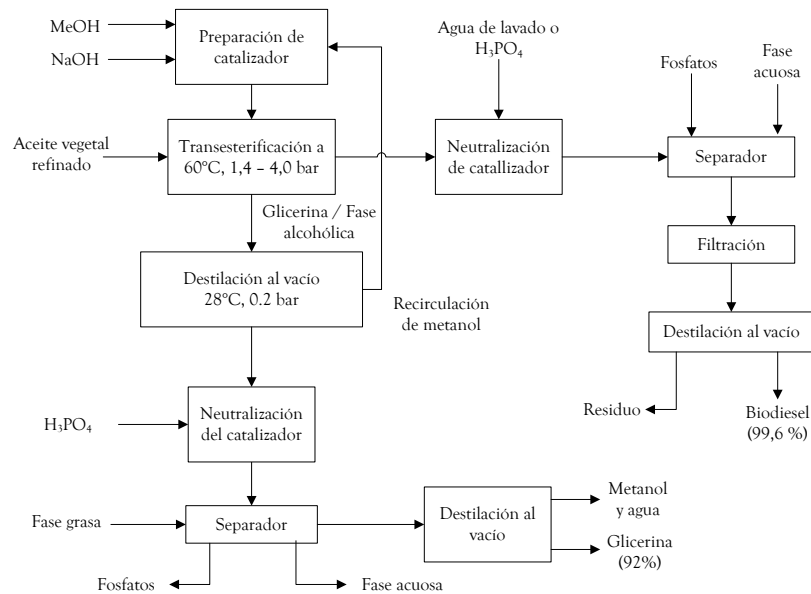


Figura 10. Esquema de producción de biodiesel catalizado por álcali. Adaptado de [24]

4.3.2. Producción catalizada por ácido

En este tipo de proceso se usa principalmente ácido sulfúrico como catalizador para la reacción. Tiene la ventaja de no tener restricciones en cuanto a la acidez de los aceites o grasas con los que se recibe, sin embargo, el uso de ácido sulfúrico (3% en promedio [24]) implica posibles problemas de corrosión, además de la necesidad de aditivos para su precipitación y posibles contaminaciones del biodiesel con residuos de azufre, que reducen su bondad como combustible limpio. Además, el tiempo de reacción en esta forma de producción es más largo, se alcanzan menores conversiones y se requieren excesos de hasta 30:1 del alcohol usado. Un ejemplo del esquema se muestra en la Figura 11.

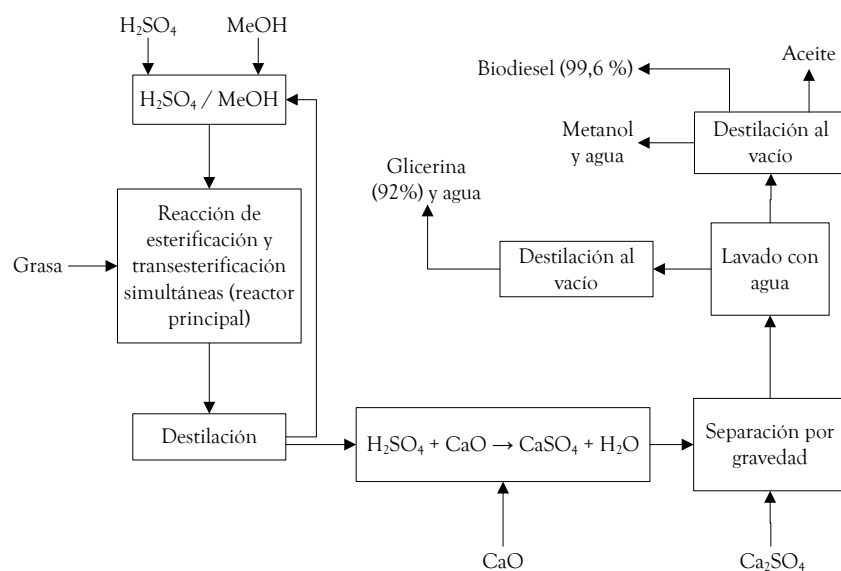


Figura 11. Esquema de producción de biodiesel catalizado por ácido. Adaptado de [24]

4.4. Producción de biodiesel mediante transesterificación catalizada por lipasas

4.4.1. Enzimas en medios orgánicos

A pesar de que la reacción de transesterificación mediante lipasas presenta importantes ventajas frente a los procesos convencionales, como por ejemplo la posibilidad de soslayar algunos de los pasos de refinamiento y purificación del aceite, no ha sido implementado a nivel industrial. Este proceso se lleva a cabo normalmente a condiciones de temperatura muy suaves (entre 20 y 60°C). También, el proceso catalizado por lipasas tiene la ventaja de separar fácilmente el biodiesel del subproducto glicerol, no requiere neutralizar el aceite, es decir, tolera la presencia de ácidos grasos libres y además los convierte en biodiesel, no se requiere desodorizar, aún con pequeños excesos de alcohol se pueden alcanzar altos rendimientos, las lipasas se pueden aplicar a todo tipo de aceites crudos, de fritura, grasas animales, acepta varios alcoholes para la transesterificación, algunas concentraciones pequeñas de agua como las que se esperaría encontrar en los aceites crudos mejora la productividad de biodiesel, entre otras [23]. En la Tabla 4 se muestra una pequeña revisión de algunas características de las reacciones catalizadas por lipasas.

4.4.2. Necesidad de un solvente para llevar a cabo la transesterificación

Los triglicéridos que componen el aceite y los alcoholes de bajo peso molecular son parcialmente inmiscibles, de tal manera que es común usar un medio que les permita solubilizarse para mejorar el acceso de ambos sustratos, triglicéridos y alcoholes, a los sitios activos de las lipasas, así como desalojar rápidamente los productos de la reacción. También protegen a las lipasas de la desnaturalización rigidizando su estructura, y en particular, el uso de solventes mantiene bajo el valor de la concentración de los alcoholes que puedan desnaturalizar o inhibir la enzima. Sin embargo, industrialmente la adición de un solvente implica adicionar pasos en el proceso de producción para su recuperación, por lo que resulta atractivo estudiar las condiciones libres de solvente.

4.4.3. Antecedentes de estudios cinéticos de la reacción

Solo algunos pocos estudios se encontraron en la literatura revisada se encontraron estudios cinéticos para la producción de biodiesel con lipasas. Al-Zuhair *et al* [25] estudiaron la cinética de la metanolisis de aceite de palma mediante lipasa libre de *Mucor miehei* en n-hexano como solvente y propusieron un mecanismo Ping Pong Bi Bi con inhibición por ambos sustratos. Dossat *et al* [26], usando esta misma reacción, estudiaron la cinética de alcoholisis con butanol de aceite de girasol con un alto contenido oleico usando lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* en n-hexano y medio libre de solvente proponiendo un mecanismo Ping Pong Bi Bi. Los datos se ajustaron al modelo con inhibición competitiva por parte del alcohol.

Tabla 4. Revisión de algunas transesterificaciones de aceites llevadas a cabo por lipasas

Alcohol	Grasa o aceite	Lipasa	Medio de reacción	Tiempo de reacción	Conversión	Referencia
Metanol	Diferentes aceites	<i>Candida antártica</i> <i>T. lanuginosus</i>	Diferentes solventes	24 h	Diferentes rangos, entre 5 y 90%	[27]
	Aceite de soja	<i>Rhizomucor miehei</i>	Libre de solvente	Hasta 8 h	Hasta 75%	[28]
	Aceite de oliva Trioleína	<i>C. antártica</i>	Libre de solvente Hexano	24 h	Hasta el 100%	[29]
	Aceite de semilla de colza	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	ter-Butanol	25 h	70 %	[30]
	Aceite de soja	<i>C. rugosa</i> <i>P. camembertii</i> <i>P. roqueforti</i>	Libre de solvente	300 min	80%	[31]
	Aceite de palma	<i>Mucor miehei</i>	Hexano	No especificado	No especificado	[25]
Etanol	Trioleína	<i>Candida antártica</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>B. cepacia</i> <i>T. lanuginosus</i>	Emulsión con agua	250 min	>95%	[32]
	Aceite rico en insaturaciones	<i>Mucor miehei</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	MTBE	No especificado	Aprox. 80%	[33]
	Aceite de girasol	<i>Mucor miehei</i>	Libre de solvente	7 h	80%	[34]
Propanol	Trioleína Aceite de alazor	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Libre de solvente	25 h	Mayor a 90%	[35]
Butanol	Aceite de girasol enriquecido en oleico	<i>Rhizomucor miehei</i>	Hexano	Hasta 50 h	80%	[36]
Diferentes alcoholes	Trioleína	<i>C. antártica</i> <i>R. miehei</i> <i>P. Cepacia</i>	Libre de solvente	Variable entre 8 - 25 h	100%	[37]

Una propuesta más extensa del mecanismo de la alcoholólisis fue propuesta por Camacho *et al* [33]. Esta consiste en tomar los pasos según la reacción, aunque aumentando el número de triglicéridos tomados en cuenta de acuerdo con la posición de la cadena de ácido graso e incluyendo como paso del mecanismo la migración de las cadenas de ácido graso en diferentes posiciones (migración (1,2)/(2,3)- a (1,3)-diacilglicéridos y (2)- a (1)/(3)-monoacilglicéridos) (ver Figura 12). La reacción fue estudiada usando trioleína y etanol como sustratos, así como un aceite con alto contenido de ácido oleico y etanol, mediante lipasas inmovilizadas de *Mucor miehei* y *Rhizopus oryzae* en metil *ter*-butil éter como solvente. Se realizó la derivación de las ecuaciones para describir la variación de la concentración de los tri-, di- y monoglicéridos (sumando todas las combinaciones para cada acilglicérido) respecto al tiempo usando la suposición de estado estable para los complejos enzima – sustrato.

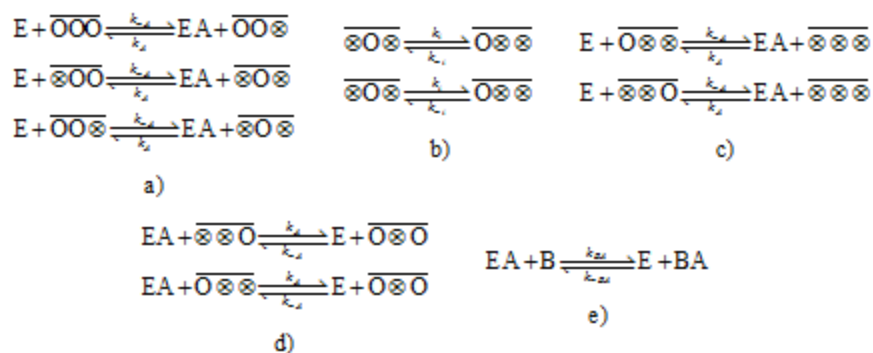


Figura 12. Mecanismo de reacción propuesto por Camacho *et al* [33]: a) Desacilación del triglicérido a través del complejo acil - enzima para producir los diglicéridos, b) Isomerización del 2-monoglicérido a 1(3)-monoglicérido, c) Formación de glicerol del 1(3)-monoglicérido por parte de la lipasa, d) Formación del 1,2-diglicérido del 1(3)-monoglicérido por esterificación del grupo acilo liberado del triglicérido, e) Esterificación del grupo acilo liberado del triglicérido a través del complejo acil - enzima con el alcohol

Otra propuesta interesante es la hecha por Cheirslip *et al* [38]. En ésta se involucra al agua como un sustrato adicional además de aceite de palma y etanol, de tal manera que se tomaron en cuenta tanto reacciones de transesterificación como hidrólisis de los glicéridos y esterificación de los ácidos grasos libres. En este trabajo se utilizó lipasa de *Pseudomonas sp.* inmovilizada en polvo de polipropileno micro poroso. Se propusieron tres mecanismos para el proceso en donde de nuevo se hace la suposición de estado estable para los complejos enzima - sustrato en los cuales se incluyó la inhibición por alcohol. Los datos experimentales se ajustaron mejor al tercer mecanismo.

Las reacciones catalizadas por lipasas, generalmente se describen mediante ecuaciones que representan un mecanismo Ping Pong Bi Bi, para lo cual implica que un sustrato se añade primero a la enzima y libera un producto y una molécula de enzima intermedia que posteriormente recibe al otro sustrato y de nuevo realiza la misma operación para liberar el segundo sustrato y dejar la forma inicial de la enzima.

4.5. La actividad termodinámica y el coeficiente de actividad

4.5.1. Definiciones generales

Como para toda propiedad termodinámica, el uso y la definición de la actividad de una sustancia requieren definir previamente unos estados de referencia para los componentes de la mezcla a los cuales se refiere esta propiedad. La selección de estos estados de referencia lleva a valores diferentes de la misma, y generalmente depende de la aplicación en la que se va a usar. Incluso, la escala con la que la composición de la mezcla es medida (por ejemplo mediante fracciones molares, molalidades o molaridades) afectará el valor final de la propiedad.

En general, para un estado de referencia “+” con una temperatura T igual a la del sistema real con una presión de referencia P^+ y con composiciones de referencia c_1^+, \dots, c_{n-1}^+ , la *actividad termodinámica* de una sustancia i , $a_i^{(c)}$ en una solución a temperatura T , presión P y composiciones c_1, \dots, c_{n-1} se define como [39]:

$$\bar{G}_i(T, P, c_1, \dots, c_{n-1}) - \bar{G}_i^+(T, P, c_1^+, \dots, c_{n-1}^+) = RT \ln a_i^{(c)} \quad (1)$$

En donde \bar{G}_i es la energía libre de Gibbs molar parcial del componente i de la solución real. El superíndice (c) sobre la actividad indica que la medida de composiciones viene indicada por la escala c y deja implícito el estado de referencia escogido.

Una propiedad más conocida para la descripción del comportamiento de propiedades termodinámicas es la fugacidad de la sustancia i . Esta propiedad también se define como una diferencia entre \bar{G}_i y una energía evaluada en un estado de referencia de gas ideal a la temperatura del sistema y $P = 1$ bar. Introduciendo esta propiedad [39-40]:

$$a_i^{(c)} = \frac{\bar{f}_i(T, P, c_1, \dots, c_{n-1})}{\bar{f}_i^+(T, P^+, c_1^+, \dots, c_{n-1}^+)} \quad (2)$$

De manera general, se puede llamar al *coeficiente de actividad* con respecto al estado de referencia “+” y escala de concentraciones c como:

$$\gamma_i^{(c)}(T, P, c_1, \dots, c_{n-1}) = \frac{\bar{f}_i(T, P, c_1, \dots, c_{n-1})}{c_i \bar{f}_i^+(T, P^+, c_1^+, \dots, c_{n-1}^+)} \quad (3)$$

4.5.2. Estados de referencia en la actividad y el coeficiente de actividad

Es claro que la propiedad llamada coeficiente de actividad no fija algún estado de agregación particular, y por consiguiente se puede calcular coeficientes de actividad en cualquiera de ellos, sin embargo, en sistemas gaseosos su uso es prácticamente nulo, ya que para gases es muy fácil definir como estado de referencia el gas ideal y utilizar directamente la fugacidad, ya que la energía libre de Gibbs no presenta discontinuidades por cambio de fase. En fases condensadas, sin embargo, una definición de estado de referencia de gases ideales supone el problema de calcular o medir el cambio de este estado a una fase condensada real. En estos casos es más plausible usar como estado de referencia a una solución ideal, en donde esta se define como el del componente puro en el estado de agregación de la mezcla a las mismas condiciones de temperatura y presión, aunque su calor de mezclado y su cambio de volumen por el mezclado sean cero. Probablemente este estado de referencia sea el más utilizado para la actividad y se ha utilizado en un sin número de aplicaciones en estado líquido con mezclas de componentes no electrolitos. Para este se define:

$$\bar{f}_i^+ = f_i^L(T, P) \quad (4)$$

También es de uso común en mezclas de no electrolitos como escala de composición a la fracción molar, por lo que aplicando las ecuaciones (1), (2) y (4):

$$RT \ln a_i^{(x)} = \bar{G}_i^L(T, P, x_1, \dots, x_{n-1}) - G_i^L(T, P) \quad (5)$$

$$\gamma_i^{(x)} = \frac{\bar{f}_i^L(T, P, x_1, \dots, x_{n-1})}{x_i f_i^L(T, P)} = \frac{a_i^{(x)}}{x_i} \quad (6)$$

En algunos casos en los que no es muy conveniente usar una fracción molar como la escala de composiciones, pero el mismo estado de referencia (compuesto puro como líquido a la temperatura y presión de la mezcla) se han definido coeficientes de actividad con escala en la fracción másica [41]. En estos casos es común relacionar los coeficientes con ambas escalas mediante la ecuación (7):

$$\gamma_i^{(w)} = \frac{\gamma_i^{(x)}}{M_i \sum_{j=1}^C \frac{w_j}{M_j}} \quad (7)$$

Adicionalmente, en el caso de sustancias que a las condiciones de la mezcla (T, P) no existen en el mismo estado de agregación (por ejemplo, sustancias sólidas o gases disueltos en un líquido, sustancias disueltas en fluidos supercríticos) o simplemente en soluciones muy diluidas en las cuales la fracción molar no es una medida conveniente de la composición, se acostumbra a definir una sustancia como “solvente” y utilizar para esta el estado de referencia convencional, y a los “solutos” se les aplica un estado de referencia (\bullet) que tiene un comportamiento hipotético. A esta convención de estados de referencia usualmente se le llama asimétrica [39-40].

Normalmente en soluciones diluidas de no electrolitos, este comportamiento hipotético está basado en una proporcionalidad entre la fugacidad de este estado ideal y la escala de composición [40]. En este estado hipotético, se comparte un punto que ayuda a relacionar este coeficiente de actividad con cualquier otro, particularmente aquellos cuyo estado de referencia es la sustancia pura, y es el valor a dilución infinita de cada soluto en el solvente. Suponiendo que la escala de composiciones para ambos estados es la fracción molar, entonces:

$$\gamma_i^{(*)}(T, P, x_1, \dots, x_{n-1}) = \frac{\gamma_i^{(x)}(T, P, x_1, \dots, x_{n-1})}{\gamma_i^{(x)}(T, P, x_i = 0)} \quad (8)$$

Es muy conveniente escoger como composición del estado de referencia, una composición unitaria en la misma escala de la mezcla con el fin de evitar conflictos con unidades de concentración ($c_i^\bullet = 1 \text{ M}, 1 \text{ m}, \text{ etc.}$), de tal manera que si suponemos que la escala es la molaridad C_i en mol/L, podemos relacionar este coeficiente con una escala en la fracción molar reconociendo que el volumen molar de la mezcla (\bar{V}_{MEZCLA}) es igual al del solvente ($\bar{V}_{\text{SOLVENTE}}$) en el límite de dilución infinita [42]:

$$\gamma_i^{(C)} = \frac{\gamma_i^{(*)} V_{\text{MEZCLA}}}{V_{\text{SOLVENTE}}} \quad (9)$$

En este trabajo resulta de particular importancia un estado de referencia que relacione la actividad termodinámica medida mediante concentraciones de los compuestos diluidos en un solvente, tal que $c_i^\circ = 1 \text{ g/mL}$. Aplicando la ecuación (9) se puede convertir del estado deseado a un estado asimétrico medido con fracciones másicas (*):

$$\gamma_i^{(c)} = \gamma_i^{(*)} \frac{\rho_{\text{SOLVENTE}}}{\rho_{\text{MEZCLA}}} \quad (10)$$

Usando la ecuación (8) se puede convertir este a una convención simétrica y usando la ecuación (7) se puede convertir la escala a fracciones molares, de tal manera que:

$$a_i = \gamma_i c_i / c_i^\circ \quad (11)$$

$$\gamma_i = \frac{\rho_s}{\rho_{\text{MEZCLA}}} \frac{1}{\left(M_i \sum_{j=1}^{NC} \frac{w_j}{M_j} \right)} \frac{\gamma_i^{(x)}}{\gamma_i^\infty} \quad (12)$$

De aquí en adelante en el texto, la supresión del superíndice en el coeficiente de actividad o la actividad termodinámica indicará que la escala de composiciones usada es la concentración másica en g/mL y bajo el estado de referencia asimétrico. También se obviará la cantidad c_i° de las expresiones.

4.5.3. El modelo NRTL

Existen diferentes modelos matemáticos planteados para describir el comportamiento de los coeficientes de actividad, y en una muy buena parte, estos están basados en estados de referencia de sustancia pura y con escala de fracciones molares [39]. En este trabajo se utilizó uno de los modelos más utilizados para representar datos termodinámicos con coeficientes de actividad de mezclas de no-electrolitos, el modelo NRTL (*Non-Random Two Liquids*) propuesto por Renon y Prausnitz [43] y consta de las siguientes ecuaciones:

$$\ln \gamma_i^{(x)} = \frac{\sum_{k=1}^{NC} x_k \tau_{ki} G_{ki}}{\sum_{k=1}^{NC} x_k G_{ki}} + \sum_{k=1}^{NC} \frac{x_k G_{ik}}{\sum_{m=1}^{NC} x_m G_{mk}} \left(\tau_{ik} - \frac{\sum_{m=1}^{NC} x_m \tau_{mk} G_{mk}}{\sum_{m=1}^{NC} x_m G_{mk}} \right) \quad (13)$$

$$G_{ik} = \exp(-\alpha_{ik} \tau_{ik})$$

$$\tau_{ij} = a_{ij} + \frac{b_{ij}}{T} \quad (14)$$

4.6. Biocatálisis enzimática en medios no acuosos

4.6.1. El uso de enzimas para catálisis en medios no acuosos

Las enzimas en su medio natural catalizan las reacciones en medios acuosos, y anteriormente se creía que no podían actuar en medios orgánicos debido a que se desnaturalizaban o desactivaban en estos [44]. Sin embargo, a partir del trabajo de Klibanov [45] se demostró que una esterificación era posible en medios orgánicos. Este trabajo dio lugar a una nueva rama de estudio, la enzimología, que abarca el estudio del medio de reacción pero también involucra el estudio de las estructuras de las enzimas y otros temas relacionados.

Los medios en los que la catálisis enzimática puede ser llevada a cabo se pueden esquematizar como [46]: (1) acuoso, (2) miscibles en agua (homogéneos acuosos – orgánicos), (3) inmiscibles en agua (Bifásicos acuosos – orgánicos), (4) no acuosos (homogéneos orgánicos), (5) anhidros, (6) fluidos supercríticos [47-49], (7) micelas invertidas [50], (8) sistemas libres de solvente, (9) en fase gaseosa y (10) líquidos iónicos.

Los solventes orgánicos ofrecen varias ventajas frente a los sistemas acuosos [44, 49, 51-52], por ejemplo:

- a. Mejoran la solubilidad de sustratos no polares en el medio, lo que marcadamente acelera las velocidades de reacción, permite una mejor recuperación de productos y facilita la recuperación de los biocatalizadores que generalmente son insolubles.
- b. Direccionamiento del equilibrio termodinámico para favorecer reacciones que en medio acuoso son imposibles, por ejemplo, la esterificación en vez de la hidrólisis de ésteres [44], la transesterificación, tioesterificación y la aminólisis, así como la supresión de reacciones colaterales como la hidrólisis de anhídridos ácidos y ésteres halogenados [53].
- c. Mejoran la estabilidad térmica de las enzimas. Diferentes sistemas han mostrado gran estabilidad térmica usando solventes orgánicos, por ejemplo, la lipasa pancreática de los porcinos que cataliza la reacción entre tributirina y varios alcoholes primario y secundarios incluso a 100°C por varias horas [44].
- d. Alteran la selectividad de la enzima [54-57].

En medios orgánicos, la actividad de una enzima se ve afectada por algunos factores como la actividad de agua, el pH del último medio acuoso en el que haya estado la enzima, la temperatura, la solvatación de producto, la forma de la enzima y la naturaleza del solvente [53].

Una enzima en medios acuosos se activa siempre y cuando haya alguna cantidad esencial de agua alrededor de ella. El agua es crítica para las enzimas y las influencia en varias formas: mediante enlaces no covalentes y el rompimiento de enlaces de hidrógeno, facilitando la difusión de los reactivos e influenciando el equilibrio de la reacción. Un bajo contenido de agua generalmente reduce la actividad de la enzima así como también lo hace un alto contenido, ya que genera agregados de partículas de enzima y causa limitaciones difusionales. Las cantidades óptimas de agua están en un estrecho rango. Para cuantificar la presencia de agua es preferida la actividad de agua en la enzima a la cantidad de ésta [44, 46, 58]. Sin embargo, ¿cómo saber el efecto que el solvente ejerce sobre la actividad de agua?

4.6.2. Evaluación de la influencia del medio de reacción en catálisis enzimática e ingeniería del medio

Con “ingeniería del medio” (*medium engineering*) se ha referido en el contexto de la biocatálisis en medios no acuosos a la modificación en la inmediata vecindad del biocatalizador [46, 59], con el objetivo de influenciar las propiedades de la enzima cambiando la naturaleza del solvente. El término fue acuñado por primera vez por Klivanov *et al* [44] quienes indicaban esto como integración a la ingeniería de proteínas [53]. La ingeniería del medio se ha convertido en algo de primordial importancia para llevar a cabo una manera efectiva los diversos tipos de reacciones que se pueden catalizar mediante una enzima.

Condoret *et al* [60] han desarrollado un método para cuantificar el efecto que un solvente tiene sobre la cantidad de agua que adsorbe en la enzima mediante la predicción de curvas de adsorción, y utilizaron datos para lipasa de *Candida rugosa* obtenidos por De La Casa *et al* [61]. Este se basa en formular un equilibrio termodinámico entre el agua en la fase con el solvente y el agua en el sólido (enzima) adsorbido. En este sentido es imperativo tener una forma de correlacionar la actividad de agua en el sólido, y una medida termodinámica de la actividad de agua en el solvente, que puede ser una correlación de coeficientes de actividad como UNIFAC o una ecuación de estado para gases o vapores. Esta aproximación tiene una base teórica, y puede ser implementado para describe el efecto, no solo, como en el caso de estudio propuesto en este trabajo, sino también en otro tipo de reacciones como las esterificaciones, en donde existe una producción o consumo de agua constante que influye sobre la actividad de agua y que es imposible de controlar como lo presenta Sandoval *et al* [62]. Sin embargo, el principal inconveniente es la formulación adsorbida. Uno de los modelos más importantes para la descripción de isothermas de adsorción se presenta por el grupo de Riazi [63-64], en el que una expresión sencilla se convierte en una solución general y rápida para predecir isothermas de adsorción.

Un medio o solvente polar (hidrofílico) puede desorber alguna cantidad de esta agua ligeramente unida a la enzima, mientras que un solvente no polar (hidrofóbico) no realiza efectos sobre la enzima, por lo que el primero requiere una cantidad mayor de agua para alcanzar una determinada actividad. Las velocidades de reacciones catalizadas por enzimas son muy dependientes de a_w , la actividad de agua, y el efecto que ésta tiene sobre la enantioselectividad es más complejo, incluso algunos resultados pueden parecer contradictorios en la literatura. En el equilibrio de las esterificaciones o transesterificaciones catalizadas por hidrolasas la actividad de agua favorece la reacción contraria, la hidrólisis del producto en las esterificaciones, o la hidrólisis del agente acilante del producto en las transesterificaciones [53].

La protonación de varios grupos en la enzima es importante tanto en medio acuoso como en medio orgánico, aunque en el primero, simples ajustes de pH bastan, en el segundo ni siquiera se puede definir claramente un pH. Lo que sí es claro, es que en estos medios es muy importante el último valor de pH del medio en que la enzima fue recuperada (por liofilización o precipitación-) [53].

Las enzimas parecen “recordar” las condiciones acuosas donde fueron preparadas, por ejemplo, las actividades catalíticas de α -quimotripsina y Subtilisina Carlsberg en varios solvente orgánicos fueron medidos como una función de la suspensión en que la enzima fue preparada. La suspensión directa de la enzima liofilizada en un solvente con un contenido de 1% de agua fue comparada con la precipitación de la misma enzima en su solución acuosa por dilución con un solvente anhidro [44].

Otro aspecto que la ingeniería del medio tiene en cuenta es la concentración de sustrato empleada en la reacción. Como la reacción de esterificación catalizada por lipasa en un solvente orgánico es reversible, es común usar un exceso de un sustrato para desplazar el equilibrio hacia la formación de producto [48, 55, 65-66]. En otros medios no acuosos como los supercríticos, la presión representa un parámetro importante a tener en cuenta [67-68], e incluso la longitud de cadena de los sustratos ha sido considerada en algunos trabajos [69].

Para racionalizar todos los fenómenos presentados sobre el efecto de las variables, tanto las cinéticas como las correspondientes a ingeniería del medio se han postulado diferentes teorías que explican este efecto [53]:

- a. El solvente, dependiendo de su polaridad, puede modificar la configuración de la enzima, y por tanto, el proceso de reconocimiento entre sustrato y enzima.
- b. La solubilidad depende de la energética involucrada en la solvatación del sustrato.
- c. Las moléculas de solvente pueden enlazarse en el sitio activo, y dependiendo de su estructura interferir con la producción de un enantiómero más que el otro.

Sin embargo, estas teorías no han sido llevadas para efectos prácticos a un término de velocidad de reacción. Las aproximaciones cuantitativas de los efectos son escasas y en su mayoría representan correlaciones simples de términos de análisis de una reacción enzimática como la selectividad (en cualquiera de sus formas) con parámetros del solvente. Al seleccionar el solvente adecuado se tienen que considerar varios aspectos que incluyen la compatibilidad con la reacción seleccionada, que sea inerte, una baja densidad para minimizar las limitaciones de transferencia de masa y otras propiedades (tensión superficial, toxicidad, inflamabilidad, etc.) [46]. El tipo de solvente utilizado, así como la reacción de la enzima a este solvente son de gran importancia para la actividad catalítica. Generalmente, los medios hidrofóbicos resultan en una mayor actividad de la enzima. Para correlacionar este efecto se utilizad el coeficiente de partición $\log P$, que es un coeficiente de partición del solvente en una mezcla estándar de octanol – agua. Este coeficiente se usa como una medida de la hidrofobicidad del medio, y a dado resultados satisfactorios. También se han utilizado otros parámetros sin mayores éxitos, como el momento dipolar, la constante dieléctrica, etc.

La influencia de la termodinámica en este tipo de reacciones ha sido muy poco utilizad a y solo ha surgido de manera reciente la posibilidad que ésta presenta frente a la generalización del efecto del solvente en la reacción, sin embargo, sería uno de los principales aportes que se puede hacer está en las reacciones enzimáticas [70]. Klibanov *et al* [59, 71] formularon un modelo teórico basado en la termodinámica de solvatación del solvente que postula que cualquier tipo de selectividad (

k_{cat}/K_M) será proporcional a la razón de los coeficientes de actividad de las porciones desolvatadas de los sustratos en el estado de transición relevante a la reacción. Esta razón se calcula mediante tres pasos, primero se determina la porción desolvatada del sustrato usando un modelamiento molecular basado en la estructura cristalina de la enzima, luego se aproxima esta parte desolvatada a un compuesto modelo distinto, y finalmente se utiliza el modelo UNIFAC para calcular el coeficiente de actividad de este compuesto modelo para calcular la selectividad.

4.6.3. La aproximación TABEK

Recientemente se ha propuesto una interesante propuesta denominada TABEK (*Thermodynamics Based Enzyme Kinetics*) [72] sobre el estudio de la reacción de esterificación de ácido oleico con etanol para producir oleato de etilo catalizada por la enzima inmovilizada Lipozyme de *R. miehei* [49, 62]. En este estudio se pretende reemplazar en la ecuación de la velocidad de reacción a las concentraciones de los componentes por sus actividades termodinámicas, que a su vez, son calculadas mediante el modelo UNIFAC para coeficientes de actividad, y mediante este modelo se ven influenciados por el solvente. De esta manera los coeficientes cinéticos se esperarían que sean iguales sin importar el solvente. Al compararse con diferentes solventes puros la precisión es aceptablemente buena, sin embargo, al utilizar mezclas de n-hexano y 5-metil-2-penthexanona los resultados obtenidos tenían forma similar a los experimentales, pero con datos subestimados. Los autores aplican una correlación para caracterizar un coeficiente cinético con respecto a la hidrofobicidad del medio ($\log P$) logrando mejorar sus resultados. Esta aproximación es muy interesante desde el punto de vista teórico como uno de los pocos esfuerzos en llevar la teoría a la ingeniería de reacción del medio, ya que reduciría en gran manera el número de experimentos necesarios para seleccionar un medio adecuado. Pero a pesar de que la reacción produce agua, la actividad de agua en la enzima queda relegada a una correlación de la polaridad del solvente.

5. HIPÓTESIS

*Se puede cuantificar el efecto del medio de reacción representado en el solvente y la actividad de agua en la reacción de producción de biodiesel a partir de aceites usando lipasa de *Candida rugosa**

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Estudiar la influencia del solvente y la actividad de agua en la reacción de transesterificación de aceites catalizada por lipasa de *Candida rugosa* mediante el planteamiento de un modelo matemático para la cinética de reacción usando la aproximación TABEK

6.2. Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros termodinámicos necesarios en la descripción de la actividad termodinámica de los reactivos, productos, inertes y solventes en la reacción mediante el modelo NRTL.
- Formular un modelo matemático de velocidad de reacción en función de las actividades termodinámicas de las sustancias involucradas en la reacción e implementar los algoritmos necesarios en el software Matlab®.
- Estudiar la influencia de la actividad de agua en las constantes de acuerdo con la expresión resultante en la formulación planteada en el objetivo anterior.
- Obtener los parámetros del modelo con una sustancia como solvente y validar experimentalmente el modelo planteado en otros medios de reacción

7. METODOLOGÍA PROPUESTA

En la medida de lo posible, debido al alto número de especies químicas presentes en los aceites, que se incrementa con el número de especies generadas a partir de estas durante la reacción, se consideró hacer una simplificación importante sobre las materias primas a utilizar. En este sentido se decidió utilizar trioleína como un compuesto sustituto que representara los aceites, es decir la fuente de triglicéridos, pero que fuera susceptible de análisis y no resultara en un costo prohibitivo para el desarrollo del estudio. Esto, si bien no es riguroso, se considera viable en vista de que la mayoría de aceites vegetales tienen contenidos importantes de cadenas de ácido oleico en sus triglicéridos como se referenció en la Tabla 3. Este triglicérido se puede conseguir en el mercado en cantidades suficientes a un costo moderado, aunque no con una alta pureza (ver pág. 48). Siendo este compuesto seleccionado, se propuso la siguiente metodología para el alcance de los objetivos propuestos.

- **Objetivo 1:** Para el cumplimiento de este objetivo se propuso la siguiente metodología de búsqueda y obtención de los parámetros necesarios. Inicialmente se listaron los parámetros requeridos, así como las sustancias que componen el sistema de transesterificación, luego se realizó una búsqueda bibliográfica de publicaciones que contuvieran datos de equilibrio termodinámico (líquido – líquido, etc.) relacionados con el coeficiente de actividad de los triglicéridos más importantes de aceites vegetales, mono y diglicéridos de los mismos, ésteres que componen al biodiesel, así como glicerina y etanol. A partir de ellos se ordenaron los parámetros que hacen falta. En el caso necesario, se planteó la realización de los experimentos de inmiscibilidad necesarios para completar la lista de parámetros. Un diagrama de flujo de esta metodología se presenta en la Figura 13.

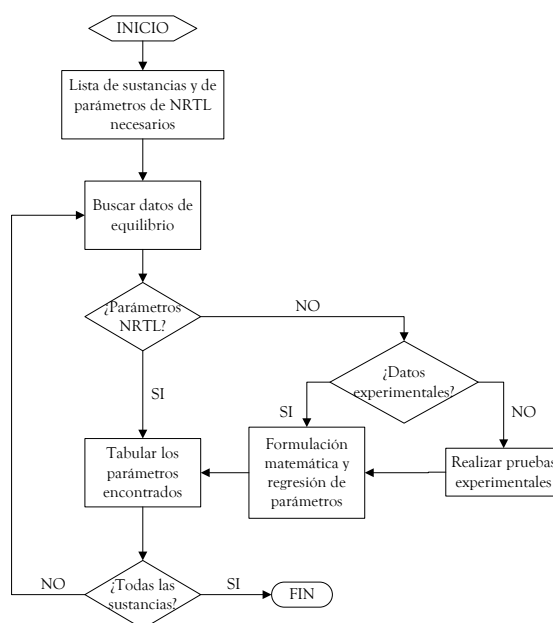


Figura 13. Metodología propuesta para la obtención de parámetros de NRTL para el sistema de transesterificación

- Objetivo 2: A partir de la teoría sobre los mecanismos de reacción catalizados por lipasas y la aproximación TABEK, se planteó la expresión requerida en términos de actividades termodinámicas de las sustancias. Para esto, se realizó una revisión bibliográfica que permita la descripción de los mecanismos y las cinéticas de reacción. Se propuso la posibilidad de desarrollar la expresión por medio del mecanismo o la sustitución de las concentraciones en las expresiones desarrolladas por actividades termodinámicas. Estos modelos se implementaron en el software Matlab® para ser utilizado en otros solventes.

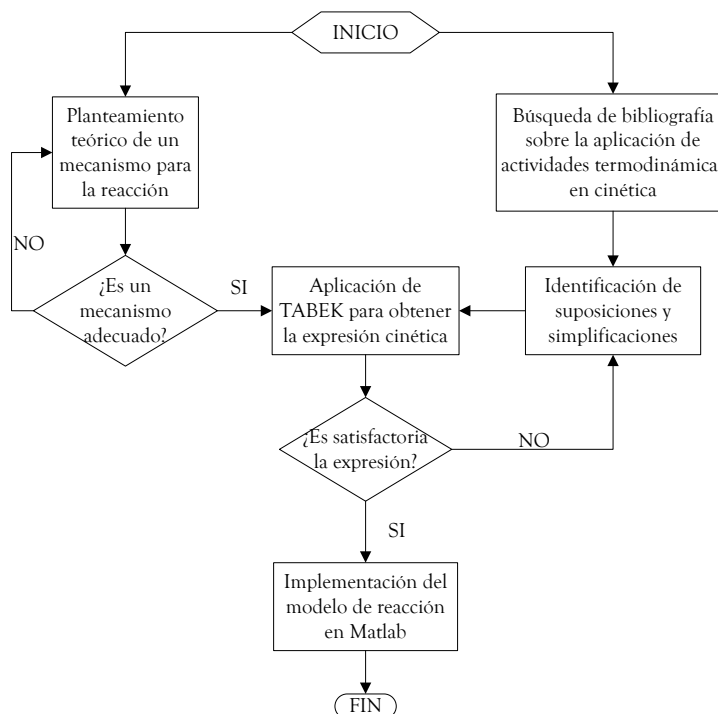


Figura 14. Metodología propuesta para la obtención de una expresión cinética basada en actividades termodinámicas

- Objetivo 3: Se realizaron corridas experimentales en los que se llevó a cabo la transesterificación con lipasas previamente ajustadas a diferentes actividades de agua usando como solvente n-hexano, y con cada conjunto de datos se realizó un ajuste experimental al modelo cinético planteado en los objetivos anteriores para obtener la variación de los parámetros frente a estas actividades de agua (Figura 15).

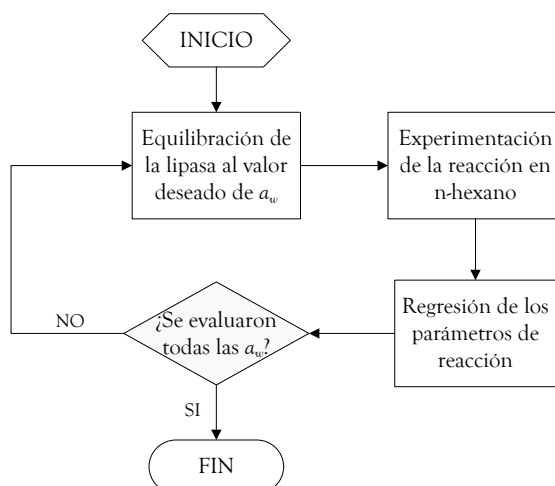


Figura 15. Metodología usada para la obtención de los parámetros del modelo para los diferentes valores de actividad de agua

- Objetivo 4: Se realizó una evaluación de la cinética obtenida mediante experimentación utilizando n-hexano como solvente en el objetivo 3 y se evaluó su capacidad de predecir los resultados de la reacción comparando con datos obtenidos en otro solvente, isooctano (Figura 16)

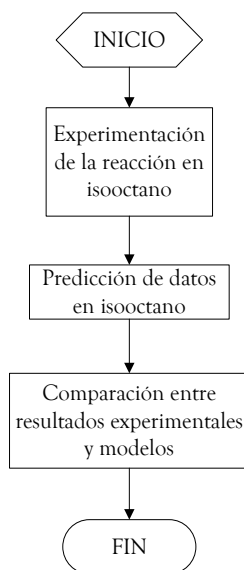


Figura 16. Metodología de evaluación del modelo cinético con los parámetros obtenidos para la reacción usando isooctano como solvente

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales usados

Los materiales usados durante el desarrollo de este trabajo se listan a continuación:

- Trioleína grado práctico obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), con una pureza de 65% según afirmación del proveedor
- Aceite de palma etiquetado como refinado, blanqueado y desodorizado (RBD) obtenido de Jabonerías Hada S.A
- Lipasa de *Candida rugosa* obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis - MO, USA), etiquetada como Tipo VII, con una actividad de 4,9 U/mg.
- Etanol anhidro, obtenido de J.T. Baker, con una pureza de 94,4%, impurezas indicadas: isopropanol 5,4%, agua 0,02%, metanol en trazas según análisis suministrados por el proveedor en su ficha técnica
- Isooctano grado reactivo obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis - MO, USA) con una pureza de 99,5% analizada por cromatografía de gas según especificación técnica del material
- Hexanos grado ACS obtenido de Honeywell (Muskegon - MI, USA) con especificaciones de 62,65% de pureza como n-hexano y 99,98% como isómeros obtenida por cromatografía de gas y contenido de agua de 0,001% obtenido mediante titulación de Karl Fischer según especificación del material
- Acetonitrilo grado HPLC obtenido de Honeywell (Muskegon - MI, USA) con especificaciones de 99,99% de pureza obtenida por cromatografía de gas y contenido de agua de 0,001% obtenido mediante titulación de Karl Fischer según especificación del material
- 2-Propanol grado HPLC obtenido de Honeywell (Muskegon - MI, USA) con especificaciones de 99,9% de pureza obtenida por cromatografía de gas y contenido de agua de 0,007% obtenido por titulación de Karl Fischer según especificación del material
- Metanol grado HPLC obtenido de Panreac (Barcelona, España) con una especificación de pureza de 99,9% según análisis de cromatografía de gas y un contenido de agua de 0,03% de acuerdo con la especificación del material
- n-Hexano grado HPLC obtenido de Panreac (Barcelona, España) con una pureza de 95,0% como n-hexano y de 98,0% como isómeros determinadas a partir de análisis de

cromatografía de gas y un contenido máximo de 0,01% de agua según lo aportado por el proveedor

- Trioleína obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MN, USA) con un 97% de pureza según indicación de análisis de cromatografía de capa fina aportado en la ficha técnica del material por el proveedor
- Estándar de cromatografía de tripalmitina obtenida de Supelco (Bellefonte - PA, USA) con una pureza de 99,4% según afirmación del proveedor
- Estándar de cromatografía de dioleoilglicerol (aprox. 85% del isómero 1,2- y 15% del isómero 1,3- según afirmación del proveedor) obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Estándar de cromatografía de dipalmitina obtenido de Supelco (Bellefonte - PA, USA) con un 99,9% de pureza según datos del proveedor sin especificación del isómero al que corresponde o si corresponde a proporciones de ambos isómeros
- Estándar de cromatografía de 1-oleoilglicerol con una pureza especificada por el proveedor de 99% obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Estándar de cromatografía de 1-monopalmitoilglicerol con 99% de pureza obtenido de Supelco (Bellefonte - PA, USA)
- Estándar de cromatografía de ácido palmítico obtenido de Laboratorios Dr. Ehrenstorfer GmbH con un 99,5% de pureza según especificación del proveedor
- Estándar de cromatografía de ácido oleico obtenido de Laboratorios Dr. Ehrenstorfer GmbH con un 98,5% de pureza según especificación del proveedor
- Oleato de etilo con 98% de pureza obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) según indicación del proveedor
- Helio grado V.
- Solución de complejo de trifluoruro de boro en etanol obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Cloruro de litio, cloruro de magnesio, carbonato de potasio, bromuro de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio. cloruro de bario

8.2. Análisis de la composición como ácidos grasos para aceite de palma y trioleína grado práctico

8.2.1. Equipo de cromatografía de gas con detección por espectrometría de masas (GC/MS)

El equipo con el que se contó en este trabajo (Figura 17) se encuentra en el Laboratorio de Instrumentación de las Plantas Piloto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Manizales, y consta de lo siguiente:

- Sistema de cromatografía de gas Agilent Technologies 6850 Series II
- Inyector automático de muestras Agilent Technologies 7383B-Series con capacidad para ocho muestras
- Detector por espectrometría de masas Agilent Technologies 5975B
- Bomba de vacío Pfeiffer Modelo DUO 2.5
- Software para control del equipo y adquisición de datos
- Purificador de Helio Agilent Big Universal Purifier RSMH-2
- Computador, impresora



Figura 17. Equipo de cromatografía de gas con detección por espectrometría de masas utilizado

8.2.2. Análisis de aceites y grasas en contenido de ácidos grasos

La técnica de análisis consiste en una transesterificación de todos los ácidos grasos libres y los unidos a cadenas de glicerina en ésteres etílicos volatilizables para análisis. Esta derivatización se lleva a cabo mediante los siguientes pasos:

1. Adicionar a 50 μ L de muestra de aceite 1 mL de solución de trifluoruro de boro (BF_3) en etanol
2. Agitar por 30 segundos en vórtex

3. Llevar a 80°C durante 40 min
4. Adicionar 2 mL de hexano para efectuar una extracción líquido-líquido
5. Se toman 125 μ L de la fase superior y se diluyen con 1 mL adicional de hexano para ser llevada a análisis

Las condiciones del análisis se describen a continuación:

- Columna: HP – MS, 5% fenilmetilsiloxano de 30 m de longitud, 250 μ m de diámetro y 0,25 μ m de diámetro de poro
- Gas de arrastre: Helio con un flujo constante de 1,2 mL/min
- Temperatura del detector: 300 °C
- Programación de temperatura del horno: 70°C por 2 min, luego aumentando a 20°C/min hasta 230 °C.

8.3. Equilibración gravimétrica de la lipasa

Para lograr unas condiciones establecidas de actividad de agua, a_w , sobre la lipasa de *Candida rugosa* usada en las reacciones de transesterificación, se sometieron a equilibración gravimétrica con soluciones saturadas de sales que contienen unos valores preestablecidos de a_w . El sistema se muestra en la Figura 18 y consta de un compartimento cerrado con recipientes para las soluciones saturadas, y un soporte con una malla donde se deposita la lipasa correspondiente a equilibrar de acuerdo con el método presentado por Rockland [73].

Dependiendo de la sal usada se obtiene un valor de actividad de agua diferente. En la Tabla 5 se observan los valores de actividad a 40°C. La solución de sal se prepara adicionando a cantidades establecidas de sal agua suficiente para crear una solución con exceso de saturación. En los soportes se añadieron cantidades debidamente pesadas de lipasa, registrando estos valores y se puso tanto el recipiente de sal, como los soportes en el compartimento cerrado. Diariamente se registraron los pesos del soporte con la malla hasta obtener un peso constante en una balanza que tiene precisión de $\pm 0,001$ g. Dependiendo de la sal, el tiempo requerido osciló entre 4 días y 2 semanas. Cuando el peso se mantuvo constante por tres días, se midió el valor de la actividad de agua con un medidor Pawkit (Decagon, USA, con exactitud de $\pm 0,02$ en 5 minutos) con una precisión en el valor de a_w de $\pm 0,01$ para comprobación. Una vez las lipasas fueron equilibradas se utilizaron en el protocolo de la reacción.

Tabla 5. Sales utilizadas para la equilibración, preparación y valor de actividad de agua [73]

Temperatura	Sal	a_w
40°C	LiCl	0,112
	MgCl ₂	0,327
	K ₂ CO ₃	0,432
	NaBr	0,577
	NaCl	0,753
	KCl	0,843
	BaCl ₂	0,903



Figura 18. Montaje para la equilibración de lipasas: Compartimento cerrado de sales, soporte y equilibración (derecha) y medidor de actividad de agua (izquierda).

8.4. Montaje experimental de las reacciones de transesterificación

Las reacciones se llevaron a cabo en frascos de vidrio Schott con tapa de 25 mL. Todas las muestras se montaron en baño termostatado Thermo Fischer Scientific capaz de controlar la temperatura con una precisión de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ y la velocidad de agitación. De acuerdo con las cantidades determinadas por el diseño experimental que se usó (ver sección 12.1), se añadieron en su orden la cantidad dispuesta de trioleína y 200 mg de la lipasa, luego el solvente, y se sometieron a la agitación por al menos 20 min para lograr una buena dispersión de la lipasa en todo el medio y evitar la inhibición al agregar etanol en la reacción.

La reacción se da inicio cuando se añade la cantidad de etanol al sistema. Cada 6 horas se abrieron las tapas de cada frasco Schott y se extrajeron alícuotas de 150 μL de cada reacción y se almacenaron en viales con tapa y su respectivas septas. Estos se taparon y se sometieron por 5 min a agua hirviendo con el fin de eliminar las posibles influencias de la lipasa en esta alícuota. Posteriormente estos viales se dejaron secar y se almacenaron para posterior análisis.

8.5. Seguimiento de la reacción de transesterificación por HPLC

8.5.1. Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

El equipo con el que se contó para el desarrollo del método de seguimiento de la reacción es un equipo LaChrom Elite adquirido de Merck Colombia (Figura 19) ubicado en el Laboratorio de Instrumentación de las Plantas Piloto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Manizales, el cual viene equipado con:

- Bomba cuaternaria Hitachi VWR L-2130
- Horno para columnas Hitachi L-2300
- Detector UV Hitachi L - 2400

- Automuestreador Hitachi L - 2200 con capacidad para 200 muestras
- Software EZChrom Elite Client/Server® de control, adquisición y análisis de datos
- Computador, impresora



Figura 19. Equipo de cromatografía líquida HPLC usado

8.5.2. Protocolo de análisis de la reacción

Para el análisis se tomaron los viales que se almacenaron durante las reacciones y se les adicionaron 1500 μL de isopropanol para disolver la muestra. Los viales fueron colocados en el inyector del equipo y se ejecutó el análisis mediante el software instalado en el computador conectado al equipo. Al terminar el análisis, los cromatogramas fueron almacenados y se presentó el reporte correspondiente de las concentraciones de cada grupo de sustancias.

Las condiciones del análisis se listan a continuación:

- Columna: Lichrospher® RP-18 de 250 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 5 μm de diámetro de poro.
- Método de detección: UV a 215 nm de longitud de onda
- Fase móvil: Reservorio A: Acetonitrilo, Reservorio B: Isopropanol, Reservorio C: n-hexano
- Método de elución: Gradiente, 49% A, 27% B y 24% C durante 10 minutos y aumentando hasta 100% B en 10 minutos.

SECCIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA “TRIOLEÍNA GRADO PRÁCTICO”

La materia prima utilizada, rotulada como “Trioleína grado práctico”, se analizó en términos de su composición como ácidos grasos. Este análisis también se hizo con otra muestra obtenida de fuentes locales, rotulada como “Aceite de Palma RBD” con el objetivo de comparar las proporciones de ambas materias primas. En la Tabla 6 se muestra el resultado.

Tabla 6. Resultados del análisis GC/MS y composición de materia prima y Aceite de palma RBD

Etil éster del ácido graso		Concentración [µg/mL]		Composición de ácidos grasos (% w/w)	
Nomenclatura	Nombre común	Trioleína grado práctico	Aceite de palma RBD	Trioleína grado práctico**	Aceite de palma RBD
C12:0	Láurico	ND	23,39	ND	0,19
C14:0	Tetradecanoico	111,20	64,09	0,78	0,53
C16:0	Palmitico	214,14	1910,03	1,50	15,80
C16:1	Palmitoleico	NC	ND	NC	0,00
C18:0	Esteárico	106,95	296,44	0,75	2,45
C18:1	Oleico	13238,48	9037,86	92,60	74,74
C18:2	Linoleico	597,10	718,73	4,18	5,94
C20:0	Eicosanoico	27,87*	41,54	0,19	0,34

ND: No detectado

NC: Detectado, pero no cuantificado

*: Por debajo del límite de detección

**: Al no ser cuantificable el éster de ácido palmitoleico, la composición es en base libre de esta sustancia

Así mismo, se realizaron análisis por HPLC del contenido de tri-, di-, monoglicéridos y ácidos grasos libres a la trioleína grado práctico de acuerdo con el método presentado en el apartado anterior. En la Tabla 7 se muestran los resultados de los análisis.

Tabla 7. Resultados del análisis por HPLC de los aceites analizados

	Concentración [g/mL]	Composición (% w/w)
Triglicéridos	0,8027	88,21
Diglicéridos	0,0594	6,53
Monoglicéridos	0,0375	4,12
Ácidos grasos	0,0112	1,24

Cabe resaltar de ambos resultados que la selección de trioleína como el componente a representar a los aceites resulta acertada en la medida en que no solo, como se mencionó en la metodología, el contenido en ácidos grasos tiene siempre como común a todos los distintos tipos de aceites la presencia de ácido oleico, sino que de manera particular, para un material que se encuentra en la región el contenido de este ácido en los triglicéridos es alto, así como son igualmente bajos los contenidos de di-, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

10. REPRESENTACIÓN DEL COMPORTAMIENTO TERMODINÁMICO DE LAS SUSTANCIAS DEL SISTEMA

10.1. Listado de parámetros necesarios para usar NRTL

Siguiendo las indicaciones propuestas en la metodología, es necesario listar los parámetros requeridos para el modelo NRTL en una mezcla hipotética que contiene trioleína (triglicéridos), dioleína (diglicéridos), monooleína (monoglicéridos), etanol, etil oleato (biodiesel), glicerol y solvente (n-hexano). El modelo NRTL presentado en la ecuación (13) solo contiene parámetros definidos por cada par de sustancias i y j , α_{ij} , τ_{ij} y τ_{ji} , de tal manera que para las siete sustancias tenemos 21 pares a tomar en cuenta como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros de NRTL necesarios para la descripción termodinámica

i	Sustancia	Par		Parámetros	Par		Parámetros	Par		Parámetros
		i	j		i	j		i	j	
1	Trioleína (triglicéridos)	1	2	$\alpha_{12}, \tau_{12}, \tau_{21}$	2	4	$\alpha_{24}, \tau_{24}, \tau_{42}$	3	7	$\alpha_{37}, \tau_{37}, \tau_{73}$
2	Etanol	1	3	$\alpha_{13}, \tau_{13}, \tau_{31}$	2	5	$\alpha_{25}, \tau_{25}, \tau_{52}$	4	5	$\alpha_{45}, \tau_{45}, \tau_{54}$
3	Etil oleato (biodiesel)	1	4	$\alpha_{14}, \tau_{14}, \tau_{41}$	2	6	$\alpha_{26}, \tau_{26}, \tau_{62}$	4	6	$\alpha_{46}, \tau_{46}, \tau_{64}$
4	Glicerol	1	5	$\alpha_{15}, \tau_{15}, \tau_{51}$	2	7	$\alpha_{27}, \tau_{27}, \tau_{72}$	4	7	$\alpha_{47}, \tau_{47}, \tau_{74}$
5	Dioleína (diglicéridos)	1	6	$\alpha_{16}, \tau_{16}, \tau_{61}$	3	4	$\alpha_{34}, \tau_{34}, \tau_{43}$	5	6	$\alpha_{56}, \tau_{56}, \tau_{65}$
6	Monooleína (monoglicéridos)	1	7	$\alpha_{17}, \tau_{17}, \tau_{71}$	3	5	$\alpha_{35}, \tau_{35}, \tau_{53}$	5	7	$\alpha_{57}, \tau_{57}, \tau_{75}$
7	n-Hexano	2	3	$\alpha_{23}, \tau_{23}, \tau_{32}$	3	6	$\alpha_{36}, \tau_{36}, \tau_{63}$	6	7	$\alpha_{67}, \tau_{67}, \tau_{76}$

En algunos casos no se encuentran valores para τ_{ij} , sino parámetros que indican su dependencia con respecto a la temperatura de acuerdo con la ecuación (14), por consiguiente, en caso de encontrarse el valor correspondiente, se presentarán el dato correspondiente a 40°C, o en caso de encontrar datos para la variación, se presentarán los valores de estos (a_{ij} , b_{ij}).

10.2. Datos experimentales y parámetros NRTL obtenidos

Para el caso de aceites, diferentes autores se han valido de modelos termodinámicos para explicar, preferentemente comportamientos de inmiscibilidad entre aceites y otras sustancias de uso común en el procesamiento de estos, como compuestos de valor nutricional [41, 74-75], ácidos grasos, alcoholes, etc. En la mayoría de estos estudios, no se toman en cuenta las especies individuales de triglicéridos, sino que de manera similar a como se hace en este trabajo, se reúnen algunas sustancias bajo un solo pseudo-compuesto que los sustituye bajo la denominación del aceite correspondiente. En la Tabla 9 se presenta una recopilación de los trabajos encontrados en la literatura y los modelos utilizados en cada uno.

Considerando que la trioleína grado práctico tiene un alto contenido de cadenas de ácido oleico se recopilaron los parámetros de la literatura a partir de los trabajos presentados en la Tabla 9 en los aceites que contenían este ácido en mayor proporción, y se recopilaron los valores de parámetros de NRTL útiles en este trabajo. Estos se muestran en la Tabla 10.

Tabla 9. Recopilación de datos con modelos termodinámicos usados para evaluar el coeficiente de actividad termodinámica de aceites vegetales y sustancias relacionadas a la producción de biodiesel

Sustancias analizadas	Modelo termodinámico	Referencia
Agua – etanol – ácido oleico	NRTL	[76]
Aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, canola, y de soya	NRTL	[77]
Trioleína, etanol, ácidos grasos, aceite de canola y de maíz	UNIFAC	[78]
Aceite de salvado de arroz – ácidos grasos – etanol – agua	NRTL UNIQUAC	[79]
Aceite de palma – ácidos grasos – etanol – agua	NRTL UNIQUAC	[80]
Aceites insaturados – ácido linoleico – Etanol – Agua	NRTL UNIQUAC	[81]
Aceite de canola – Ácido oleico – Alcoholes de cadena corta	NRTL UNIQUAC	[82]
Aceite de semilla de algodón – Ácido linoleico – Etanol – Agua – Tocoferoles	NRTL UNIQUAC	[41]
Aceite de nuez de Brasil y madacadamia – ácido oleico – Etanol – Agua	NRTL UNIQUAC	[83]
Aceite de maíz – Ácido oleico – Etanol – Agua	NRTL UNIQUAC	[84]
Aceite de <i>Jathropa curcas</i> L. – Metanol – Glicerol – metil ésteres	Ninguno	[85]
Aceite de soya – Etanol – Etil ésteres – Glicerol	Ninguno	[86]
Aceite de semilla de algodón, maíz, canola y soya refinado – Etanol – Hexano	Ninguno	[77]

Tabla 10. Parámetros extraídos de la literatura de ELL de aceites con alto contenido en C18:1

Ref.	Aceite	C18:1 (% w/w)	Parámetros				
			a_{12}	a_{21}	b_{12} [K]	b_{21} [K]	α_{12}
[77]	Canola refinado	62,56	0,0	0,0	33,495	1541,9	0,47000
[83]	Macadamia	59,76	0,0	0,0	503,38	1414,0	0,48908
[82]	Canola	48,45	0,0	0,0	-95,552	1514,3	0,45906
[87]	Salvado de arroz	38,50	0,0	0,0	873,64	1416,8	0,49874
Ref.	Aceite	C18:1 (% w/w)	a_{17}	a_{71}	b_{17} [K]	b_{71} [K]	α_{17}
[77]	Canola refinado	62,56	0,0	0,0	-461,78	360,68	0,4700

Adicionalmente, algunos simuladores de procesos químicos comerciales como Aspen Plus, contienen parámetros de NRTL para algunas sustancias que pueden ser consultados. Usando la licencia disponible en la Universidad Nacional de Colombia – Sede Manizales, se obtuvieron algunos parámetros que se muestran en la Tabla 11.

Dentro de la literatura consultada se encontraron pocos datos que no contienen referencias a equilibrios líquidos para aceites, sin embargo, el trabajo presentado en [88] resulta de particular importancia. Se trata de una medición de la presión de vapor de soluciones de trioleína o ácido oleico y un solvente orgánico, en donde también se calcularon los coeficientes de actividad de

ambas sustancias en cada mezcla líquida. Entre las combinaciones que son reportadas se encuentra una mezcla de n-hexano – trioleína, y a partir de estos datos se realizó una regresión de los parámetros para el par 1,7. La regresión se hizo mediante el software Matlab®, usando el comando *nlinfit* que consiste en una minimización de la suma de los cuadrados del error para cada dato experimental mediante un método de Levenberg–Marquardt que viene implementado en la misma. Los resultados de esta se presentan en la Tabla 12 y el ajuste se muestra en la Figura 20.

Tabla 11. Parámetros obtenidos de la base de datos de Aspen Plus®

Par		Parámetros				
<i>i</i>	<i>j</i>	α_{ij}	a_{ij}	a_{ji}	b_{ij} [K]	b_{ji} [K]
1	7	0,3000	0,0	0,0	-176,7499	232,9091
2	4	0,3000	0,0	0,0	442,7130	36,1390
2	7	0,4700	0,0	0,0	497,8083	738,6402

Tabla 12. Parámetros de NRTL estimados a partir de los datos presentados en [88]. Solvente (1) – Trioleína (2)

Solvente (1)	Parámetros		
	α_{12}	τ_{12}	τ_{21}
n-Hexano	0,0126	0,3533	-0,1251
Acetona	19,6773	-0,0236	-0,0311
2-Propanol	-0,9062	0,4489	0,7375

A pesar de los parámetros recolectados, estos no son suficientes para obtener la descripción planteada, y en particular, no se encontraron datos experimentales en la literatura revisada que permitieran estimar los parámetros para las combinaciones que incluyen dioleína y monooleína, de tal manera que fue imposible obtener parámetros para la mayoría de combinaciones con éstos. Además, tampoco se contó con la posibilidad de realizar los experimentos, debido a que sustancias como dioleína o monooleína no se consiguen en el mercado excepto en presentación de estándares para cromatografía, lo que impone un costo prohibitivo dado que las cantidades normalmente requeridas para un ensayo son bastante altas comparado con las ampollas o presentaciones de 100 mg o menos que usualmente tales estándares.

10.3. Uso de modelos predictivos tipo UNIFAC

Dado que según lo planteado en la metodología, para los siguientes ítems de este trabajo es necesario un modelo de coeficiente de actividad que estime esta propiedad para todas las sustancias del sistema, se decidió cambiar de estrategia y evaluar modelos más predictivos, como los modelos de contribución de grupos basados en UNIFAC, que tienen la capacidad de estimar estos valores dividiendo las moléculas de las sustancias tratadas en grupos funcionales previamente establecidos, sin necesidad de usar datos experimentales, aunque sacrificando su capacidad para correlacionar los sistemas. En ese orden de ideas se presenta el modelo UNIFAC y sus variantes a evaluar frente a los datos experimentales.

- Modelo UNIFAC [89]: El objetivo de este modelo es de predecir el comportamiento de la actividad termodinámica mediante la contribución de grupos funcionales con los cuales se construye la molécula. Como tal, su principal ventaja es que es totalmente predictivo, ya

que no requiere de datos experimentales para obtener sus parámetros, aunque los valores de los parámetros por cada par de grupos funcionales se han regresado de extensas recopilaciones de datos experimentales de diversas propiedades relacionadas de sustancias que los contienen. En la Tabla 13 se presenta la descomposición de las sustancias usadas en este trabajo mediante UNIFAC.

$$\ln \gamma_i^{(x)} = \ln \gamma_i^{comb} + \ln \gamma_i^{res} \quad (15)$$

$$\begin{aligned} \ln \gamma_i^{comb} &= 1 - \phi_i - \ln \phi_i - 5q_i \left(1 - \frac{\phi_i}{\theta_i} + \ln \frac{\phi_i}{\theta_i} \right) \\ \phi_i &= r_i / \sum_{k=1}^{NC} r_k x_k, \quad \theta_i = q_i / \sum_{k=1}^{NC} q_k x_k \\ r_i &= \sum_{k=1}^{NGS} v_k^{(i)} R_k, \quad q_i = \sum_{k=1}^{NGS} v_k^{(i)} Q_k \\ \ln \gamma_i^{res} &= \sum_{k=1}^{NGS} v_k^{(i)} \left[\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)} \right] \\ \ln \Gamma_k &= Q_k \left[1 - \ln \left(\sum_{m=1}^{NGS} \Theta_m \Psi_{mk} \right) - \sum_{m=1}^{NGS} \frac{\Theta_m \Psi_{km}}{\sum_{n=1}^{NGS} \Theta_n \Psi_{nm}} \right] \\ \Theta_m &= X_m Q_m / \sum_{n=1}^{NGS} X_n Q_n \\ X_m &= \sum_{p=1}^{NC} v_m^{(p)} x_p / \sum_{n=1}^{NGS} \sum_{p=1}^{NC} v_n^{(p)} x_p \\ \Psi_{mk} &= \exp \left(-\frac{a_{mn}}{T} \right) \end{aligned}$$

- Modelo UNIFAC - ACEITES: Uno de los inconvenientes de UNIFAC es la poca habilidad para predecir el comportamiento de equilibrios líquido - líquido, por tal razón, la base de datos original de los parámetros de UNIFAC fue reestructurada y sus parámetros fueron estimados nuevamente, pero usando únicamente datos experimentales de este tipo [90]. Recientemente, usando esta reestructuración se presentó una modificación de algunos valores de los parámetros ajustables del modelo con el fin de ajustar mejor los equilibrios líquidos que contengan triglicéridos [78]. Esencialmente, son las mismas ecuaciones (15), solo que los parámetros y la definición de los grupos funcionales cambia ligeramente. Para efectos del presente trabajo esta variación de UNIFAC se etiquetará como UNIFAC - ACEITES. En la Tabla 14 se encuentra la asignación de grupos funcionales por molécula usada en este trabajo.
- Modelo UNIFAC Dortmund [91]: Cuenta con modificaciones en los términos del modelo UNIFAC originalmente concebidos para lograr buenos ajustes frente a datos

experimentales de equilibrios líquido-líquido, como equilibrios líquido - vapor, sólido líquido, etc. En la Tabla 15 se encuentra la asignación de grupos funcionales por molécula usada en este modelo.

$$\ln \gamma_i^{(x)} = \ln \gamma_i^{comb} + \ln \gamma_i^{res} \quad (16)$$

$$\begin{aligned} \ln \gamma_i^{comb} &= 1 - \phi_i - \ln \phi_i - 5q_i \left(1 - \frac{\phi_i}{\theta_i} + \ln \frac{\phi_i}{\theta_i} \right) \\ \phi_i &= r_i / \sum_{k=1}^{NC} r_k x_k, \quad \phi'_i = r_i^{3/4} / \sum_{k=1}^{NC} r_k^{3/4} x_k, \quad \theta_i = q_i / \sum_{k=1}^{NC} q_k x_k \\ r_i &= \sum_{k=1}^{NGS} v_k^{(i)} R_k, \quad q_i = \sum_{k=1}^{NGS} v_k^{(i)} Q_k \\ \ln \gamma_i^{res} &= \sum_{k=1}^{NGS} v_k^{(i)} \left[\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)} \right] \\ \ln \Gamma_k &= Q_k \left[1 - \ln \left(\sum_{m=1}^{NGS} \Theta_m \Psi_{mk} \right) - \sum_{m=1}^{NGS} \frac{\Theta_m \Psi_{km}}{\sum_{n=1}^{NGS} \Theta_n \Psi_{nm}} \right] \\ \Theta_m &= X_m Q_m / \sum_{n=1}^{NGS} X_n Q_n \\ X_m &= \sum_{p=1}^{NC} v_m^{(p)} x_p / \sum_{n=1}^{NGS} \sum_{p=1}^{NC} v_n^{(p)} x_p \\ \Psi_{mk} &= \exp \left(-\frac{a_{mn}}{T} \right) \end{aligned}$$

El uso de expresiones basadas en UNIFAC para sustancias que intervienen en sistemas de transesterificación ya ha sido evaluado en [92], con resultados buenos para predecir el equilibrio líquido - líquido entre metanol, metil ésteres, glicerol y agua. Entonces se optó por evaluar tres variantes de UNIFAC para escoger la más adecuada usando los datos experimentales presentados en [88] de coeficientes de actividad de trioleína - n-hexano, trioleína - isopropanol y trioleína - acetona. Los resultados de la predicción con los datos experimentales se presentan en la Figura 20 para hexano - trioleína, Figura 21 para acetona - trioleína y en la Figura 22 para 2-propanol - trioleína. Como punto de comparación se estimaron los valores de parámetros para NRTL para cada par de sustancias y estos valores se muestran en la Tabla 12.

Tabla 13. División de las moléculas de los componentes usados en este trabajo mediante UNIFAC original [89]

Sustancia	CH ₃ (1)	CH ₂ (2)	CH (3)	C (4)	CH=CH (6)	OH (14)	H ₂ O (17)	CH ₃ CO (19)	CH ₂ COO (22)	COOH (43)
Trioleína	3	41	1	0	3	0	0	0	3	0
Dioleína	2	28	1	0	2	1	0	0	2	0
Monooleína	1	15	1	0	1	2	0	0	1	0
Etanol	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Etil oleato	2	14	0	0	1	0	0	0	1	0
Glicerol	0	2	1	0	0	3	0	0	0	0
n-Hexano	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetona	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2-Propanol	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Isooctano	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Ácido oleico	1	14	0	0	1	0	0	0	0	1

Tabla 14. División de las moléculas de los componentes usados en este trabajo mediante UNIFAC adaptado para sistemas grasos [78]

Sustancia	CH ₃ (1)	CH ₂ (2)	CH (3)	C (4)	CH=CH (6)	OH (14)	H ₂ O (17)	CH ₃ CO (19)	CH ₂ COO (26)	COOH (23)
Trioleína	3	41	1	0	3	0	0	0	3	0
Dioleína	2	28	1	0	2	1	0	0	2	0
Monooleína	1	15	1	0	1	2	0	0	1	0
Etanol	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Etil oleato	2	14	0	0	1	0	0	0	1	0
Glicerol	0	2	1	0	0	3	0	0	0	0
n-Hexano	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetona	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2-Propanol	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Isooctano	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Ácido oleico	1	14	0	0	1	0	0	0	0	1

Tabla 15. División de las moléculas de los componentes usados en este trabajo mediante UNIFAC Dortmund [91]

Sustancia	CH ₃ (1)	CH ₂ (2)	CH (3)	C (4)	CH=CH (6)	OH (14)	H ₂ O (17)	CH ₃ CO (18)	CH ₂ COO (22)	COOH (43)	OH(s) (81)
Trioleína	3	41	1	0	3	0	0	0	3	0	0
Dioleína	2	28	1	0	2	1	0	0	2	0	0
Monooleína	1	15	1	0	1	1	0	0	1	0	1
Etanol	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Etil oleato	2	14	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Glicerol	0	2	1	0	0	2	0	0	0	0	1
n-Hexano	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetona	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2-Propanol	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Isooctano	5	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Ácido oleico	1	14	0	0	1	0	0	0	0	1	0

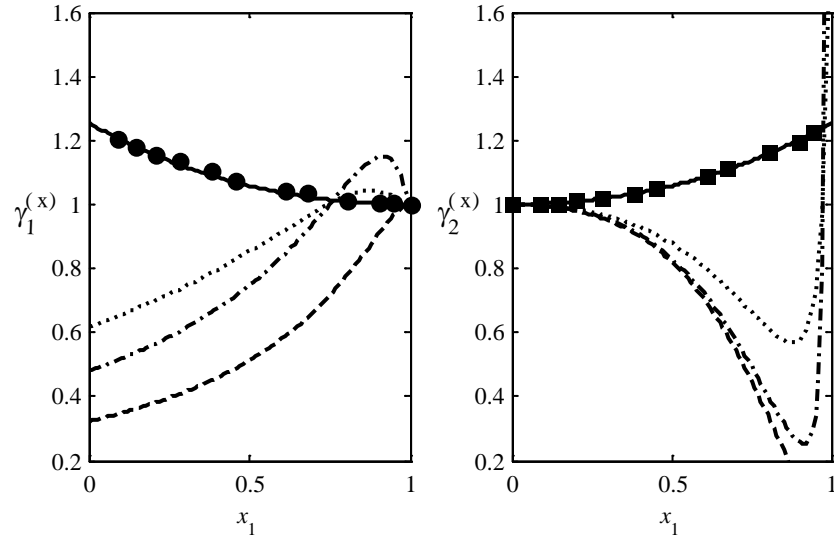


Figura 20. Datos experimentales de coeficiente de actividad presentados por [88] para una mezcla hexano (1) – trioleína (2). (●) Hexano, (■) Trioleína. En línea continua, datos modelados mediante NRTL, en línea punto–raya para la predicción de UNIFAC con parámetros para acilglicéridos, en línea punteada UNIFAC Dortmund y en línea a trazos la predicción de UNIFAC con parámetros para líquidos.

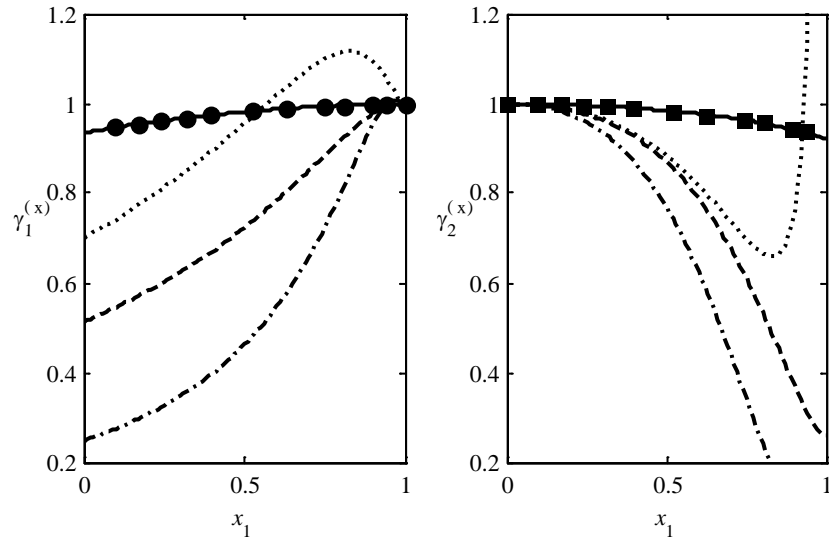


Figura 21. Datos experimentales de coeficientes de actividad presentados por [88] para una mezcla acetona (1) – trioleína (2). (●) Acetona, (■) Trioleína. En línea continua, datos modelados mediante NRTL, en línea punto–raya para la predicción de UNIFAC con parámetros para acilglicéridos, en línea punteada UNIFAC Dortmund y en línea a trazos la predicción de UNIFAC con parámetros para líquidos.

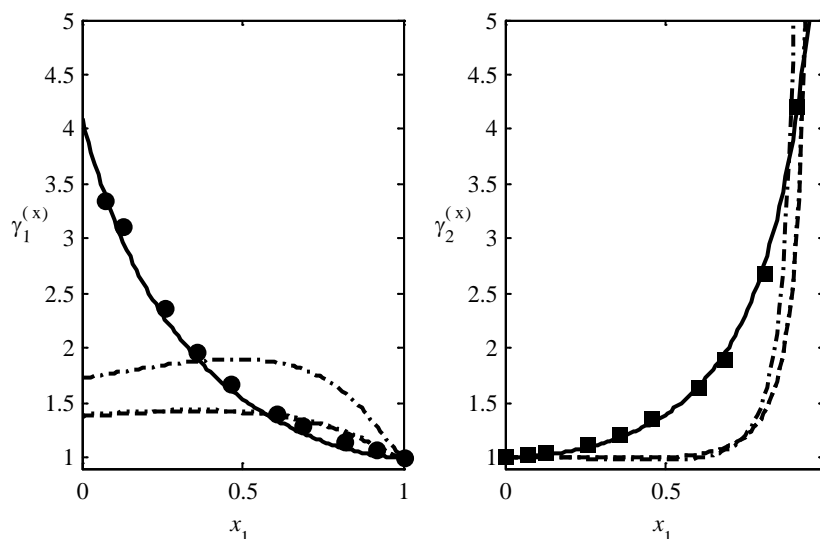


Figura 22. Datos experimentales de coeficiente de actividad presentados por [88] para una mezcla 2-propanol (1) - trioleína (2). (●) 2-Propanol, (■) trioleína. En línea continua, datos modelados mediante NRTL, en línea punto- raya para la predicción de UNIFAC con parámetros para acilglicéridos, en línea punteada UNIFAC Dortmund y en línea a trazos la predicción de UNIFAC con parámetros para líquidos.

Estos resultados muestran claramente la superioridad de NRTL frente a las variantes de UNIFAC en la predicción del coeficiente de actividad para trioleína - solventes, sin embargo, esta es también una consecuencia lógica del uso de los propios datos experimentales por parte de NRTL para obtener sus parámetros. Entre los modelos UNIFAC, las descripciones de los coeficientes de actividad de los solventes muestran un comportamiento cualitativamente diferente al de los datos experimentales, sin embargo, para trioleína, el comportamiento muestra tendencias similares a las de los datos excepto para el sistema acetona - trioleína. Cabe también aclarar, que a mayor concentración de la sustancia, los valores de los coeficientes de actividad para solvente y para trioleína en todos los modelos de UNIFAC se acercan más a los valores experimentales. Esto implica que en la medida en que se diluye la sustancia, todos los modelos UNIFAC pierden su capacidad de predicción.

También se realizó la comparación para los datos de equilibrios líquido - líquido del sistema trioleína (1) - etanol (2) - ácido oleico (8) a 20°C y 30°C presentados en [78], que se muestran en las Figura 23 y Figura 24. En este caso se nota una clara diferencia entre los tres modelos evaluados. UNIFAC y UNIFAC Dortmund predicen un área mayor en el diagrama de concentraciones en la cual existiría la inmiscibilidad a ambas temperaturas, mientras que el modelo UNIFAC - ACEITES logra una descripción muy acertada, no solo de la región donde se presenta la inmiscibilidad, sino de la manera en que las líneas de reparto separan las dos fases. Este buen resultado permite presumir que los coeficientes de actividad predichos mediante UNIFAC - ACEITES para las sustancias involucradas en la reacción, trioleína y etanol, en mezclas que los contienen no sean tan alejados como lo son para solventes. Finalmente se escoge este modelo para el cálculo de los coeficientes de actividad de aquí en adelante.

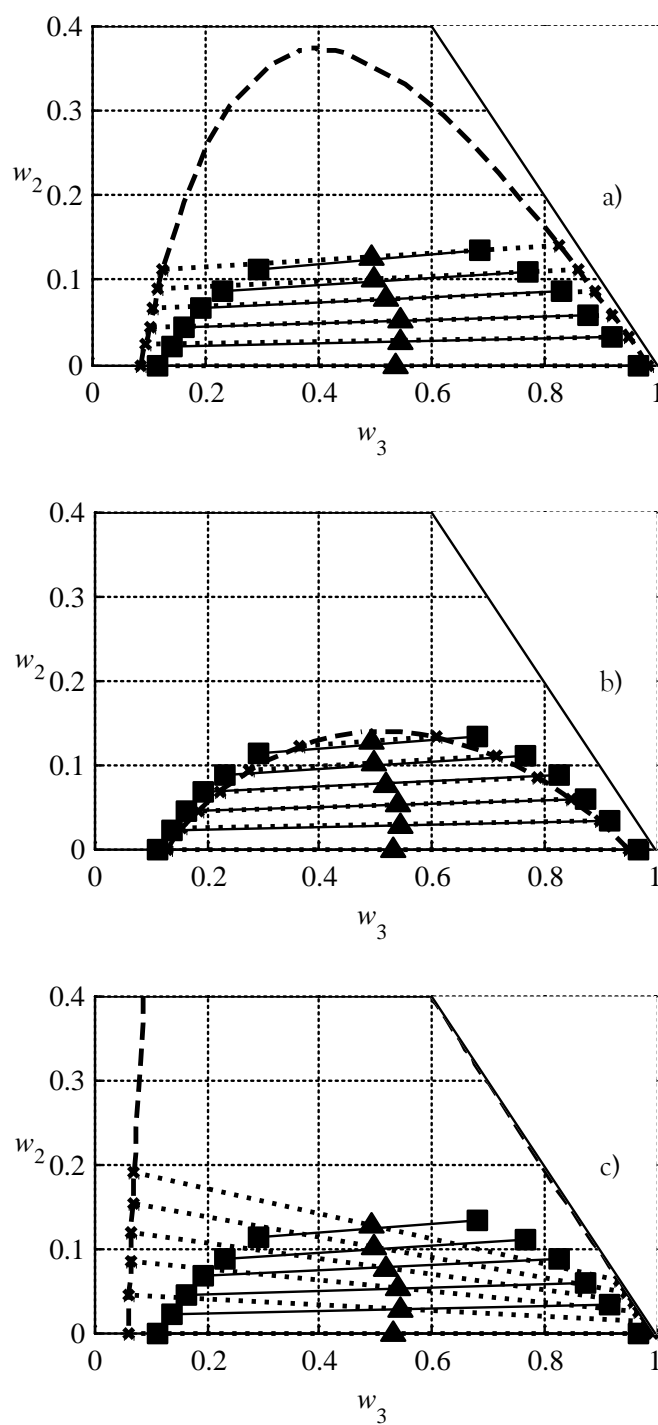


Figura 23. Datos experimentales y predicciones del ELL para el sistema trioleína (1) - ácido oleico (2) - etanol (3) a 20°C mediante: a) UNIFAC original, b) UNIFAC - ACEITES y c) UNIFAC Dortmund. (▲) Composiciones globales. (■) Datos experimentales de la línea de reparto. (--) Predicciones de líneas de reparto y envoltorio de la región de inmiscibilidad. (×) Fracciones másicas predichas de las fases inmiscibles

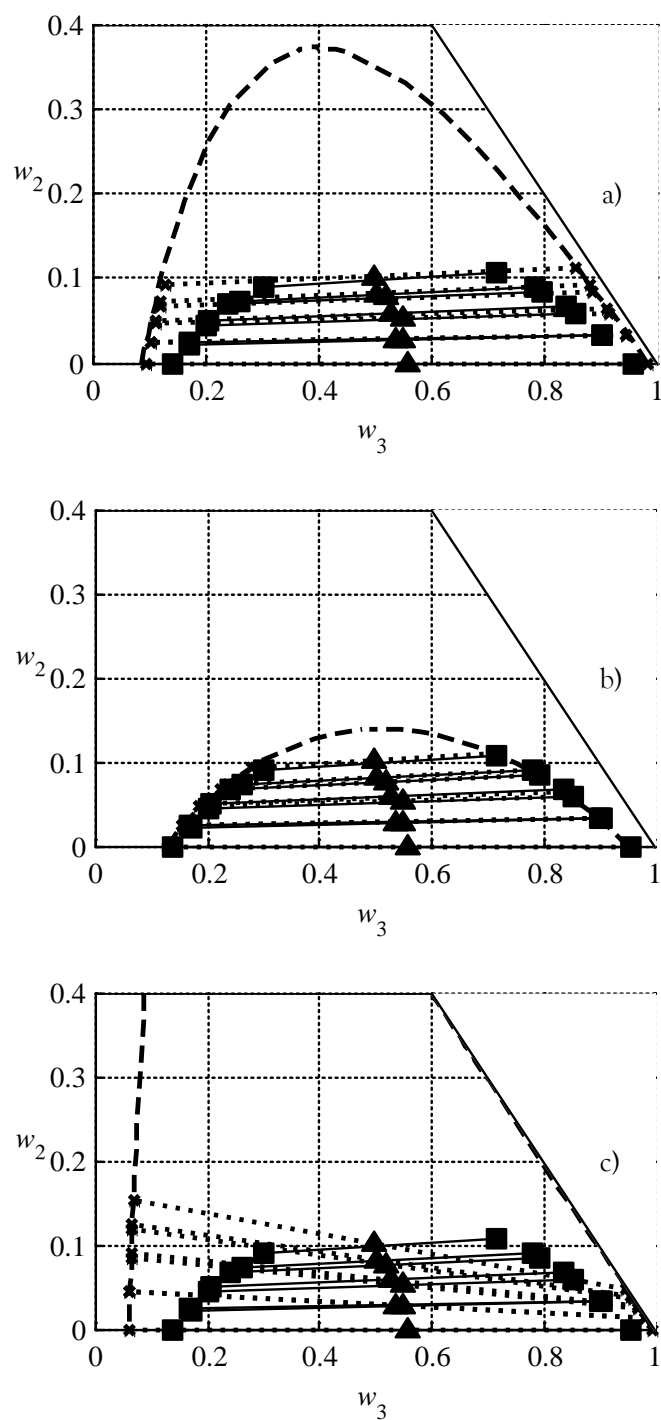


Figura 24. Datos experimentales y predicciones del ELL para el sistema trioleína (1) - ácido oleico (2) - etanol (3) a 30°C mediante: a) UNIFAC original, b) UNIFAC - ACEITES y c) UNIFAC Dortmund. (▲) Composiciones globales. (■) Datos experimentales de la línea de reparto. (--) Predicciones de líneas de reparto y envolvente de la región de inmiscibilidad. (x) Fracciones másicas predichas de las fases inmiscibles

11. PLANTEAMIENTO DEL MODELO CINÉTICO

11.1. Abstracción matemática del mecanismo de acción de las lipasas

Previamente se discutió el mecanismo aceptado de acción de hidrólisis de las lipasas sobre los enlaces ésteres y el ciclo catalítico que sufre una lipasa durante esta reacción (ver sección 4.2.1.). Este ciclo catalítico se puede simplificar como se muestra en la Figura 25 asignándole a la enzima al inicio del ciclo como E y al complejo acil enzima que queda después de la salida del primer producto como F , al sustrato éster como S_1 , y al agua como el sustrato S_2 , a los intermediarios tetraédricos (Ítem 2 en la Figura 6) como ES_1 y FS_2 para ambos sustratos, que rápidamente cambian a complejos hipotéticos EP_1 y EP_2 para expresar la liberación de los correspondientes productos.

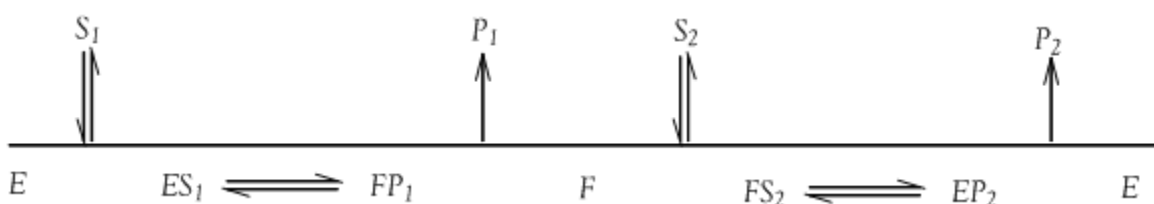


Figura 25. Esquema de la reacción de hidrólisis de ésteres mediante lipasas

Este mecanismo bisustrato es un mecanismo Ping Pong Bi Bi que puede formar la base de las aplicaciones correspondientes a catálisis con lipasas. Por ejemplo a partir de allí se puede inferir que en otras reacciones donde participan las lipasas se pueda aplicar este mismo esquema, adaptando los sustratos y productos al mismo. Supongamos una esterificación en un medio orgánico que como ya se mencionó permite que las lipasas puedan efectuar la síntesis del enlace éster. En este tipo de reacciones, el sustrato S_1 sería el ácido, el producto P_1 el agua, el sustrato S_2 el alcohol y el producto P_2 el éster. En este caso sería importante añadir las restricciones comunes que las lipasas tienen sobre los alcoholes ya que estos actúan como posibles inhibidores competitivos [93-94], de modo que se modifica el esquema anterior para incluir una inhibición competitiva por parte del alcohol (Figura 26).

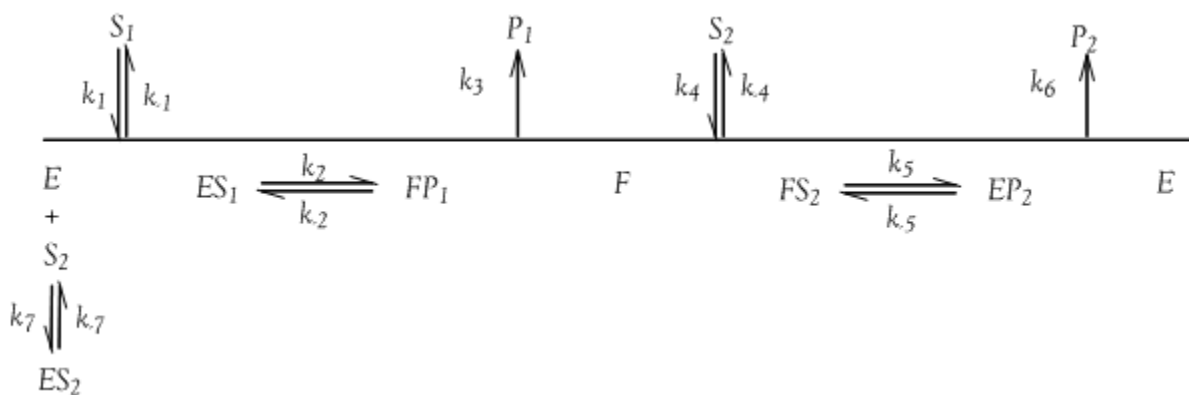


Figura 26. Aplicación de la abstracción del mecanismo a una esterificación en medio orgánico

Al realizar los balances de masa para cada especie y tomando como etapa límite la producción de P_2 , nos lleva a la expresión (17):

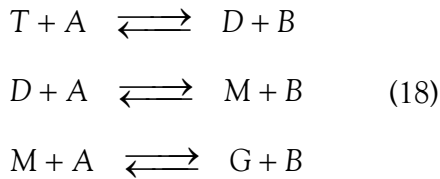
$$r = \frac{V_m c_{S_1} c_{S_2}}{K_{M,S_2} c_{S_1} + K_{M,S_1} c_{S_2} \left(1 + \frac{c_{S_2}}{K_I}\right) + c_{S_1} c_{S_2}} \quad (17)$$

Bezbradica *et al* [95] presentan un ejemplo aplicado a la lipasa de *Candida rugosa* para la esterificación de ácido butírico con alcohol isoamílico, en donde evalúan el comportamiento de la velocidad de reacción con respecto a dos propuestas de mecanismo, el presentado anteriormente y un ordenado Bi Bi. Estos autores concluyen que la ecuación que mejor representa la velocidad de reacción es la ecuación (17). Sandoval *et al* [96] estimaron la velocidad de reacción de una esterificación de ácido oleico y etanol catalizada por lipasa inmovilizada de *Rhizomucor miehei* a partir de este mecanismo, aunque usando actividades termodinámicas como las variables en la ecuación, luego de haber deducido la correspondiente expresión encontrando buenos ajustes y Xu y Liu [97] encontraron para una interesterificación de aceite de soya con acetato de metilo catalizada por lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada que este tipo de mecanismo funciona, suponiendo que el acetato de metilo inhibía la enzima.

Así pues, este mecanismo para la expresión del ciclo catalítico de la lipasa de *Candida rugosa* se encuentra satisfactorio para ser usado en la producción de biodiesel a partir de trioleína y etanol.

11.2. Planteamiento de las ecuaciones de la cinética de producción de biodiesel

A pesar del alto número de sustancias que podrían estar presentes en el reactivo trioleína, se agruparon los posibles compuestos susceptibles de análisis en triglicéridos (T), diglicéridos (D), monoglicéridos (M) y biodiesel (B). Esta idea ha sido usada para proponer cinéticas de producción enzimática de biodiesel, así como de hidrólisis e interesterificaciones [33, 38, 98]. Para obtener una visión macroscópica de la reacción, se plantearon tres reacciones entre especies químicas estables en la cual una “mol” de triglicérido se degrada parcialmente a una “mol” de diglicérido liberando una “mol” de biodiesel, y sucesivamente se degradan una “mol” de di- y monoglicéridos hasta finalmente liberar una mol de glicerol.



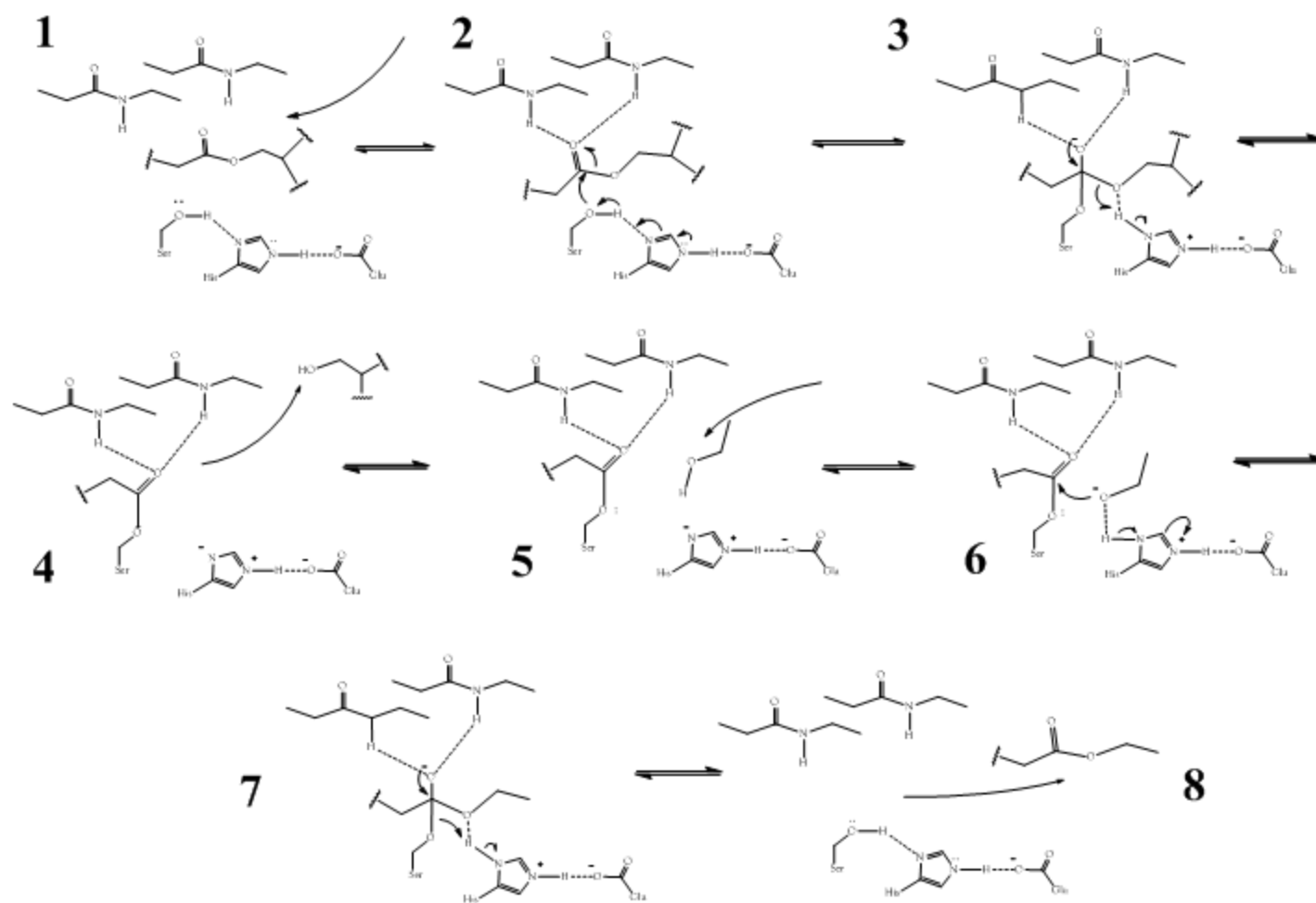
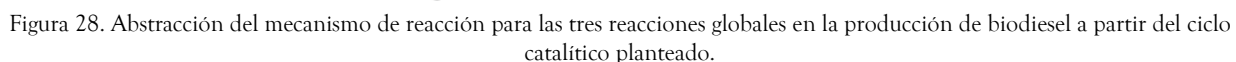


Figura 27. Planteamiento del ciclo catalítico en la transesterificación de un acilglicérido con etanol por parte de una lipasa.



También es común, debido al valor de actividad enzimática reportada para la lipasa de *Candida rugosa* usada, que el tiempo de reacción empleado no resultaría lo suficientemente grande para que la reacción llegue al equilibrio de tal manera que se encuentre este valor. Adicionalmente, tampoco se encontraron en la literatura revisada datos que indiquen que la reacción inversa se lleve a cabo en una extensión apreciable. Dadas estas simplificaciones, el mecanismo de reacción propuesto para la reacción de transesterificación de trioleína con etanol se muestra en la Figura 29.

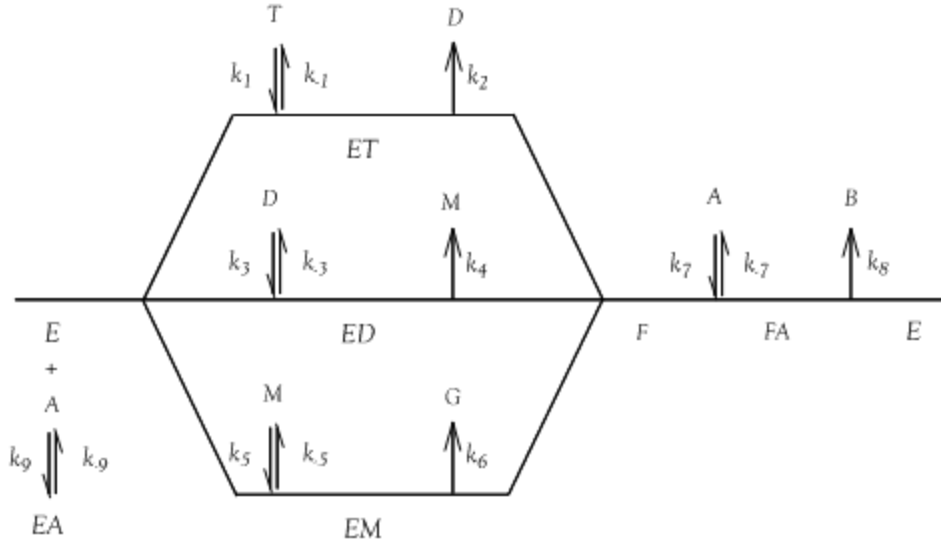
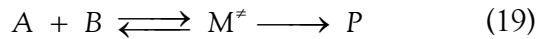


Figura 29. Mecanismo de reacción propuesto para la transesterificación enzimática de triglicéridos.

11.3. Desarrollo de la expresión cinética basada en actividades termodinámicas

11.3.1. La teoría del estado de transición

La teoría del estado de transición, aproximación usada de manera muy generalizada en términos de cinéticas químicas y enzimáticas, brinda una explicación para el comportamiento no ideal de las tasas de reacción [99]. Suponiendo que se tiene una reacción bimolecular como la que se muestra en la ecuación (19):



La teoría del estado de transición postula que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración del estado de transición M^\ddagger ($r \propto c_{M^\ddagger}$). Utilizando el equilibrio entre el estado de transición y los reactivos, convencionalmente se expresa esta concentración en términos de las concentraciones de los reactivos ($K_c^\ddagger = c_{M^\ddagger} / c_A c_B$), de tal manera que la velocidad de reacción se vuelve proporcional a la concentración de los reactivos, lo que coincide con la observación experimental de los comportamientos de las velocidades de reacción, mostrada en la ecuación (20).

$$r = k_0 c_A c_B \quad (20)$$

Usando argumentos que parten desde la mecánica estadística, la teoría del estado de transición concluye que la constante de proporcionalidad de la velocidad de reacción tiene la forma [99]:

$$k_0 = \kappa \frac{k_B T}{h} K_c^\ddagger \quad (21)$$

Sin embargo, la relación de equilibrio químico está definida de manera general no en términos de concentraciones, sino de actividades termodinámicas de las sustancias [39-40].

$$K_{eq}^{\ddagger} = \frac{a_{M^{\ddagger}}}{a_A a_B} = \frac{c_{M^{\ddagger}}}{c_A c_B} \frac{\gamma^{\ddagger}}{\gamma_A \gamma_B} \quad (22)$$

Relacionando esta ecuación con la observación experimental (20) se llega nuevamente a una ecuación que muestra una directa proporcionalidad entre la velocidad de reacción y las concentraciones de los reactivos:

$$r = k c_A c_B \quad (23)$$

Pero, en este caso la constante se vuelve dependiente de los coeficientes de actividad de todas las especies, que a su vez, son dependientes de las concentraciones:

$$k = k_0 \frac{\gamma_A \gamma_B}{\gamma^{\ddagger}} \quad (24)$$

Al reunir la ecuación (24) con la ecuación (23) se obtiene una forma que convenientemente expresa la proporcionalidad de la velocidad con respecto a las actividades termodinámicas:

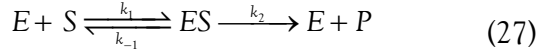
$$r = k a_A a_B \quad (25)$$

$$k = \kappa \frac{k_B T}{\hbar \gamma^{\ddagger}} K_{eq}^{\ddagger} \quad (26)$$

Es claro que la constante de proporcionalidad contiene el coeficiente de actividad del estado de transición, sin embargo es de esperarse que esta sustancia se encuentre en cantidades pequeñas y durante tiempos muy cortos, lo que lleva a considerar su valor como independiente de las concentraciones de los reactivos. Por otro lado, es claro que las ecuaciones (25) y (26) se convierten en las ecuaciones (20) y (21) en los casos en que existe idealidad termodinámica ($\gamma_i = 1$), o en donde las concentraciones no cambian lo suficiente para que cambie el valor de los coeficientes de actividad ($\gamma_i \approx cte$).

11.3.2. Cinética enzimática de Michaelis – Menten en términos de actividades

En el estudio de las cinéticas enzimáticas es muy importante el planteamiento de una cinética a partir del mecanismo más simple planteado, el mecanismo de Michaelis – Menten (ecuación (27)), ya que permite reconocer las suposiciones necesarias en su desarrollo. Ya se han hecho deducciones a partir de este mecanismo, pero en términos de actividades termodinámicas del sustrato, de la enzima y de los complejos enzima – sustrato [100-101].



Y haciendo uso de la ecuación (25), se plantea el balance de masa para el complejo enzima - sustrato considerando una aproximación de estado estable en su concentración:

$$\begin{aligned} \frac{dc_{ES}}{dt} &= k_1 a_E a_S - (k_{-1} + k_2) a_{ES} = 0 \\ a_{ES} &= \frac{k_1 a_E a_S}{k_{-1} + k_2} \end{aligned} \quad (28)$$

Se define la constante de Michaelis de la manera usual:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (29)$$

Y se obtiene la concentración del complejo enzima - sustrato en términos de actividades termodinámicas de reactivos y coeficientes de actividad reemplazando en (28):

$$c_{ES} = c_E \frac{\gamma_E}{\gamma_{ES}} \frac{a_S}{K_M} \quad (30)$$

Suponiendo un equilibrio en el primer paso del mecanismo, van Tol *et al* [100] y Lee [101] plantean el equilibrio termodinámico entre la enzima, el sustrato y el complejo enzima-sustrato en términos de las actividades termodinámicas del sustrato, la enzima y el complejo, y a partir de allí llegan a la misma expresión (30).

De acuerdo con la teoría del estado de transición:

$$r = k_2 c_{ES} = \frac{k_2}{K_M} \frac{\gamma_E}{\gamma_{ES}} c_E a_S \quad (31)$$

Y tomando el balance general de masa de la enzima:

$$\begin{aligned} c_{E_0} &= c_E + c_{ES} = c_E \left(1 + \frac{\gamma_E}{\gamma_{ES}} \frac{a_S}{K_M} \right) = c_E \frac{1}{K_M} \frac{\gamma_E}{\gamma_{ES}} \left(K_M \frac{\gamma_{ES}}{\gamma_E} + a_S \right) \\ c_E &= \frac{c_{E_0} K_M \frac{\gamma_{ES}}{\gamma_E}}{K_M \frac{\gamma_{ES}}{\gamma_E} + a_S} \end{aligned} \quad (32)$$

Al reemplazar (32) en (31) se obtiene que:

$$r = \frac{k_2 c_{E_0} a_S}{K_M \frac{\gamma_{ES}}{\gamma_E} + a_S} \quad (33)$$

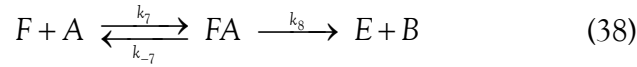
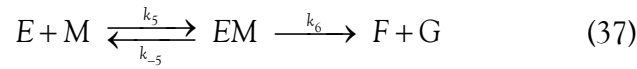
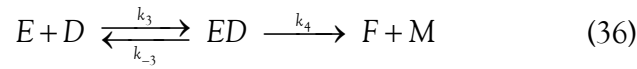
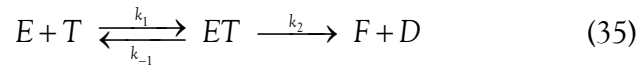
Van Tol *et al* [100] presentan como argumento que si el complejo enzima-sustrato y la enzima no cambian apreciablemente en volumen y forma incluyendo su agua estructural, la extensión de la solvatación de cada especie de enzima es igual, es decir que $\gamma_{ES} \approx \gamma_E$. Lee [101], por su parte menciona que si la estructura o la naturaleza química de la enzima y el complejo enzima - sustrato no se ve alterado por la composición del medio, se puede presumir que la razón entre los dos es una constante, que se puede integrar al valor de K_M . En ambos casos, definiendo que $V_m = k_2 c_{E_0}$, la ecuación (33) queda:

$$r = \frac{V_m a_S}{K_M + a_S} \quad (34)$$

Esta ecuación tiene la misma forma de la ecuación de Michaelis-Menten, solo que sobre las actividad termodinámica del sustrato.

11.4. Desarrollo del modelo cinético basado en actividades termodinámicas para la transesterificación de aceite con etanol

Retomando el esquema presentado en la Figura 29 se fraccionó este esquema en cuatro ecuaciones que constan de un estado de transición y una ecuación en equilibrio que representa la inhibición competitiva de la lipasa:



Para las ecuaciones (35) – (38) se estableció una velocidad de reacción siguiendo la idea presentada en [98], asignándole a cada una los parámetros r_T , r_D , r_M y r_B . De esta forma se plantea el balance de masa para las especies químicas que no son complejos enzima - sustrato (es decir, las que no son estados de transición):

$$\frac{dc_T}{dt} = -r_T \quad (40)$$

$$\frac{dc_D}{dt} = r_T - r_D \quad (41)$$

$$\frac{dc_M}{dt} = r_D - r_M \quad (42)$$

$$\frac{dc_G}{dt} = r_M \quad (43)$$

$$\frac{dc_A}{dt} = -r_B \quad (44)$$

$$\frac{dc_B}{dt} = r_B \quad (45)$$

Aplicando la suposición de estado estable para los complejos enzima - sustrato se obtienen las ecuaciones:

$$\frac{dc_{ET}}{dt} = k_1 a_E a_T - (k_{-1} + k_2) a_{ET} = 0 \quad (46)$$

$$\frac{dc_{ED}}{dt} = k_3 a_E a_D - (k_{-3} + k_4) a_{ED} = 0 \quad (47)$$

$$\frac{dc_{EM}}{dt} = k_5 a_E a_D - (k_{-5} + k_6) a_{EM} = 0 \quad (48)$$

$$\frac{dc_F}{dt} = k_2 a_{ET} + k_4 a_{ED} + k_6 a_{EM} + k_{-7} a_F a_A - k_7 a_{FA} = 0 \quad (49)$$

$$\frac{dc_{FA}}{dt} = k_7 a_F a_A - (k_{-7} + k_8) a_{FA} = 0 \quad (50)$$

$$\frac{dc_{EA}}{dt} = k_9 a_E a_A - k_{-9} a_{EA} = 0 \quad (51)$$

Se definieron las constantes de Michaelis para cada sustrato y la constante de inhibición de la manera habitual:

$$K_T = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (52)$$

$$K_D = \frac{k_{-3} + k_4}{k_3} \quad (53)$$

$$K_M = \frac{k_{-5} + k_6}{k_5} \quad (54)$$

$$K_A = \frac{k_{-7} + k_8}{k_7} \quad (55)$$

$$K_I = \frac{k_{-9}}{k_9} \quad (56)$$

Reemplazando este conjunto en las ecuaciones (46)–(48), (50) y (51) se obtiene que:

$$a_{ET} = \frac{a_E a_T}{K_T} \quad (57)$$

$$a_{ED} = \frac{a_E a_D}{K_D} \quad (58)$$

$$a_{EM} = \frac{a_E a_M}{K_M} \quad (59)$$

$$a_{EA} = \frac{a_E a_A}{K_I} \quad (60)$$

$$a_{FA} = \frac{a_F a_A}{K_A} \quad (61)$$

Reemplazando (57)–(61) en (49) se obtiene que:

$$a_E \left(k_2 \frac{a_T}{K_T} + k_4 \frac{a_D}{K_D} + k_6 \frac{a_M}{K_M} \right) + \left(\frac{-k_7 K_A + k_{-7}}{K_A} \right) a_F a_A = 0$$

$$a_F = \frac{K_A}{a_A} \left(\frac{k_2}{k_8} \frac{a_T}{K_T} + \frac{k_4}{k_8} \frac{a_D}{K_D} + \frac{k_6}{k_8} \frac{a_M}{K_M} \right) a_E \quad (62)$$

Y por consiguiente:

$$a_{FA} = \left(\frac{k_2}{k_8} \frac{a_T}{K_T} + \frac{k_4}{k_8} \frac{a_D}{K_D} + \frac{k_6}{k_8} \frac{a_M}{K_M} \right) a_E \quad (63)$$

De las ecuaciones (57)–(63) se encontraron las concentraciones de las especies de lipasa:

$$c_{ET} = c_E \frac{\gamma_E}{\gamma_{ET}} \frac{a_T}{K_T} \quad (64)$$

$$c_{ED} = c_E \frac{\gamma_E}{\gamma_{ED}} \frac{a_D}{K_D} \quad (65)$$

$$c_{EM} = c_E \frac{\gamma_E}{\gamma_{EM}} \frac{a_M}{K_M} \quad (66)$$

$$c_{EA} = c_E \frac{\gamma_E}{\gamma_{EA}} \frac{a_A}{K_I} \quad (67)$$

$$c_F = c_E \frac{\gamma_E}{\gamma_F} \frac{K_A}{a_A} \left(\frac{k_2}{k_8} \frac{a_T}{K_T} + \frac{k_4}{k_8} \frac{a_D}{K_D} + \frac{k_6}{k_8} \frac{a_M}{K_M} \right) \quad (68)$$

$$c_{FA} = c_E \frac{\gamma_E}{\gamma_{FA}} \left(\frac{k_2}{k_8} \frac{a_T}{K_T} + \frac{k_4}{k_8} \frac{a_D}{K_D} + \frac{k_6}{k_8} \frac{a_M}{K_M} \right) \quad (69)$$

En la Figura 8 se muestra la isoforma *Lip1* sin reaccionar y en la Figura 9 se presentó la misma isoforma enlazada con un triglicérido y un inhibidor. Se puede apreciar de estas imágenes que el volumen y la forma de la lipasa no se altera apreciablemente con los enlaces con sustratos, de tal manera que se retomó lo mencionado por van Tol *et al* [100], y se utilizó como suposición que los coeficientes de actividad de todos los complejos enzima-sustrato son iguales al coeficiente de actividad de la lipasa sin reaccionar, y por consiguiente su solvatación es similar:

$$\frac{\gamma_{Ei}}{\gamma_E} \approx 1 \quad (70)$$

Se llevó esta simplificación en las ecuaciones (64)–(69) al balance de masa general para la lipasa (ecuación (71)):

$$c_{E0} = c_E + c_{ET} + c_{ED} + c_{EM} + c_{EA} + c_F + c_{FA} \quad (71)$$

De donde se despejó c_E y reorganizando la ecuación se obtuvo que:

$$c_E = \frac{c_{E0}}{1 + \frac{a_T}{K_T} \left[1 + \frac{k_2}{k_8} \left(1 + \frac{K_A}{a_A} \right) \right] + \frac{a_D}{K_D} \left[1 + \frac{k_4}{k_8} \left(1 + \frac{K_A}{a_A} \right) \right] + \frac{a_M}{K_M} \left[1 + \frac{k_6}{k_8} \left(1 + \frac{K_A}{a_A} \right) \right] + \frac{a_A}{K_I}} \quad (72)$$

Así entonces, al definir la velocidad de reacción, r_T , para la ecuación (35):

$$r_T = k_2 c_{ET}$$

De tal forma que al reemplazar la ecuación (64) y la simplificación dada por la ecuación (70):

$$r_T = \frac{k_2}{K_T} c_E a_T$$

Y al sustituir c_E de la ecuación (72) y reorganizar se obtiene:

$$r_T = \frac{\frac{k_2 c_{E0}}{K_T K_A} a_T a_A}{D^*} \quad (73)$$

Donde

$$D^* = \frac{k_2}{k_8} \frac{a_T}{K_T} \left[1 + \left(1 + \frac{k_8}{k_2} \right) \frac{a_A}{K_A} \right] + \frac{k_4}{k_8} \frac{a_D}{K_D} \left[1 + \left(1 + \frac{k_8}{k_4} \right) \frac{a_A}{K_A} \right] + \frac{k_6}{k_8} \frac{a_M}{K_M} \left[1 + \left(1 + \frac{k_8}{k_6} \right) \frac{a_A}{K_A} \right] + \frac{a_A}{K_A} \left(1 + \frac{a_A}{K_I} \right)$$

De manera análoga para las ecuaciones (36) y (37), las velocidades de reacción r_D y r_M quedan expresadas como:

$$r_D = \frac{\frac{k_4 c_{E0}}{K_D K_A} a_D a_A}{D^*} \quad (74)$$

$$r_M = \frac{\frac{k_6 c_{E0}}{K_D K_A} a_D a_A}{D^*} \quad (75)$$

Para la ecuación (38):

$$r_B = k_8 c_{FA} = k_8 c_E \left(\frac{k_2}{k_8} \frac{a_T}{K_T} + \frac{k_4}{k_8} \frac{a_D}{K_D} + \frac{k_6}{k_8} \frac{a_M}{K_M} \right)$$

$$r_B = \frac{\frac{k_2 c_{E0}}{K_T K_A} a_T a_A + \frac{k_4 c_{E0}}{K_D K_A} a_D a_A + \frac{k_6 c_{E0}}{K_M K_A} a_M a_A}{D^*} \quad (76)$$

Se definieron las constantes siguientes:

$$V_{mT} = \frac{k_2 c_{E0}}{K_T K_A} \quad (77)$$

$$v_T = \frac{k_8}{k_2} \quad (78)$$

$$V_{mD} = \frac{k_4 c_{E0}}{K_D K_A} \quad (79)$$

$$v_D = \frac{k_8}{k_4} \quad (80)$$

$$V_{mM} = \frac{k_6 c_{E0}}{K_M K_A} \quad (81)$$

$$v_M = \frac{k_8}{k_6} \quad (82)$$

E introduciendo estas constantes en (73)–(76):

$$r_T = \frac{V_{mT} a_T a_A}{\frac{a_T}{v_T K_T} \left(1 + \frac{1+v_T}{K_A} a_A\right) + \frac{a_D}{v_D K_D} \left(1 + \frac{1+v_D}{K_A} a_A\right) + \frac{a_M}{v_M K_M} \left(1 + \frac{1+v_M}{K_A} a_A\right) + \frac{a_A}{K_A} \left(1 + \frac{a_A}{K_I}\right)} \quad (83)$$

$$r_D = \frac{V_{mD} a_D a_A}{\frac{a_T}{v_T K_T} \left(1 + \frac{1+v_T}{K_A} a_A\right) + \frac{a_D}{v_D K_D} \left(1 + \frac{1+v_D}{K_A} a_A\right) + \frac{a_M}{v_M K_M} \left(1 + \frac{1+v_M}{K_A} a_A\right) + \frac{a_A}{K_A} \left(1 + \frac{a_A}{K_I}\right)} \quad (84)$$

$$r_M = \frac{V_{mM} a_M a_A}{\frac{a_T}{v_T K_T} \left(1 + \frac{1+v_T}{K_A} a_A\right) + \frac{a_D}{v_D K_D} \left(1 + \frac{1+v_D}{K_A} a_A\right) + \frac{a_M}{v_M K_M} \left(1 + \frac{1+v_M}{K_A} a_A\right) + \frac{a_A}{K_A} \left(1 + \frac{a_A}{K_I}\right)} \quad (85)$$

$$r_B = \frac{V_{mT} a_T a_A + V_{mD} a_D a_A + V_{mM} a_M a_A}{\frac{a_T}{v_T K_T} \left(1 + \frac{1+v_T}{K_A} a_A\right) + \frac{a_D}{v_D K_D} \left(1 + \frac{1+v_D}{K_A} a_A\right) + \frac{a_M}{v_M K_M} \left(1 + \frac{1+v_M}{K_A} a_A\right) + \frac{a_A}{K_A} \left(1 + \frac{a_A}{K_I}\right)} \quad (86)$$

Estas son las ecuaciones de la velocidad de reacción para los cuatro pasos en los que se dividió la reacción de transesterificación y se reemplazaron en el balance de masa de las sustancias (ecuaciones (40)–(45)), arrojando el modelo final que se muestra en las ecuaciones (88)–(93). Con el fin de llevar fácilmente estas ecuaciones al software Matlab®, fue necesario reunir las constantes que se encuentran en algunos monomios en un vector de parámetros $\mathbf{\beta}$ como se indica en la ecuación (87). Los códigos creados con a partir de las ecuaciones del modelo reemplazando el vector de parámetros se muestran en el ANEXO I.

$$\boldsymbol{\beta} = \left(V_{mT} \quad V_{mD} \quad V_{mM} \quad \frac{1}{v_T K_T} \quad \frac{1+v_T}{K_A} \quad \frac{1}{v_D K_D} \quad \frac{1+v_D}{K_A} \quad \frac{1}{v_M K_M} \quad \frac{1+v_M}{K_A} \quad \frac{1}{K_A} \quad \frac{1}{K_I} \right)^T \quad (87)$$

En las Figura 30 y Figura 31 se muestran resultados con algunos valores para el vector $\boldsymbol{\beta}$ y condiciones de alimentación diferentes.

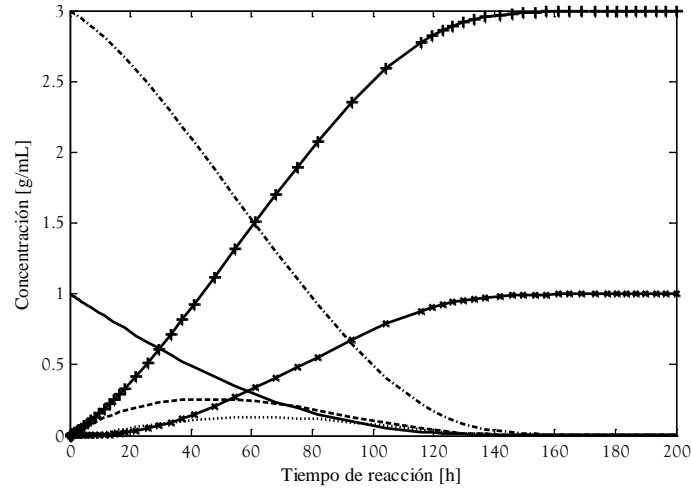


Figura 30. Simulación del modelo de transesterificación con $\boldsymbol{\beta} = (1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1 \ 1)^T$ y condiciones iniciales $c_{T0} = 1 \text{ g/mL}$, $c_{A0} = 3 \text{ g/mL}$. (-) Triglicéridos, (- -) diglicéridos, (...) monoglicéridos, (- · -) etanol, (+) biodiesel, (x) glicerol

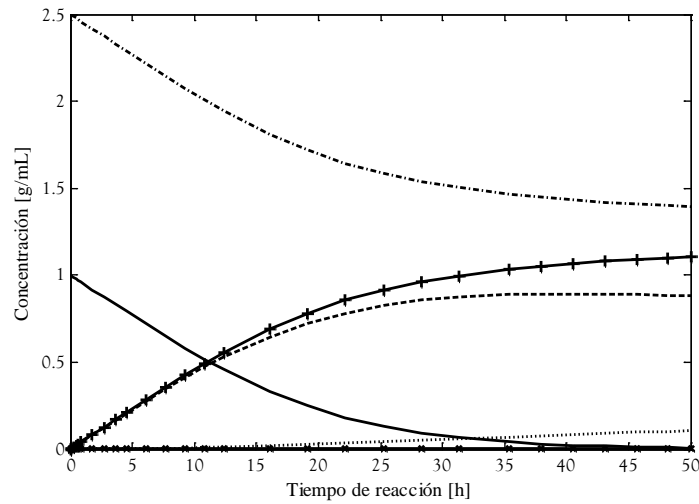


Figura 31. Simulación del modelo de transesterificación con $\boldsymbol{\beta} = (1 \ 0,03 \ 0,005 \ 0,5 \ 0,3 \ 0,1 \ 0,2 \ 0,1 \ 1,2 \ 0,7 \ 0,8)^T$ y condiciones iniciales $c_{T0} = 1 \text{ g/mL}$, $c_{A0} = 3 \text{ g/mL}$. (-) Triglicéridos, (- -) diglicéridos, (...) monoglicéridos, (- · -) etanol, (+) biodiesel, (x) glicerol

$$\frac{dc_T}{dt} = -\frac{\beta_1 a_T a_A}{\beta_4 a_T (1 + \beta_5 a_A) + \beta_6 a_D (1 + \beta_7 a_A) + \beta_8 a_M (1 + \beta_9 a_A) + \beta_{10} a_A (1 + \beta_{11} a_A)}, \quad c_T(t=0) = c_{T0} \quad (88)$$

$$\frac{dc_D}{dt} = \frac{\left(\frac{PM_D}{PM_T}\right) \beta_1 a_T a_A - \beta_2 a_D a_A}{\beta_4 a_T (1 + \beta_5 a_A) + \beta_6 a_D (1 + \beta_7 a_A) + \beta_8 a_M (1 + \beta_9 a_A) + \beta_{10} a_A (1 + \beta_{11} a_A)}, \quad c_D(t=0) = c_{D0} \quad (89)$$

$$\frac{dc_M}{dt} = \frac{\left(\frac{PM_M}{PM_D}\right) \beta_2 a_D a_A - \beta_3 a_M a_A}{\beta_4 a_T (1 + \beta_5 a_A) + \beta_6 a_D (1 + \beta_7 a_A) + \beta_8 a_M (1 + \beta_9 a_A) + \beta_{10} a_A (1 + \beta_{11} a_A)}, \quad c_M(t=0) = c_{M0} \quad (90)$$

$$\frac{dc_A}{dt} = -\frac{\left(\frac{PM_A}{PM_T}\right) \beta_1 a_T a_A + \left(\frac{PM_A}{PM_D}\right) \beta_2 a_D a_A + \left(\frac{PM_A}{PM_M}\right) \beta_3 a_M a_A}{\beta_4 a_T (1 + \beta_5 a_A) + \beta_6 a_D (1 + \beta_7 a_A) + \beta_8 a_M (1 + \beta_9 a_A) + \beta_{10} a_A (1 + \beta_{11} a_A)}, \quad c_A(t=0) = c_{A0} \quad (91)$$

$$\frac{dc_B}{dt} = \frac{\left(\frac{PM_B}{PM_T}\right) \beta_1 a_T a_A + \left(\frac{PM_B}{PM_D}\right) \beta_2 a_D a_A + \left(\frac{PM_B}{PM_M}\right) \beta_3 a_M a_A}{\beta_4 a_T (1 + \beta_5 a_A) + \beta_6 a_D (1 + \beta_7 a_A) + \beta_8 a_M (1 + \beta_9 a_A) + \beta_{10} a_A (1 + \beta_{11} a_A)}, \quad c_E(t=0) = 0 \quad (92)$$

$$\frac{dc_G}{dt} = \frac{\left(\frac{PM_G}{PM_M}\right) \beta_3 a_M a_A}{\beta_4 a_T (1 + \beta_5 a_A) + \beta_6 a_D (1 + \beta_7 a_A) + \beta_8 a_M (1 + \beta_9 a_A) + \beta_{10} a_A (1 + \beta_{11} a_A)}, \quad c_G(t=0) = 0 \quad (93)$$

Donde:

$$a_i = c_i \gamma_i \quad i = T, D, M, A, B, G \quad (94)$$

12. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA CINÉTICA DE TRANSESTERIFICACIÓN

12.1. Diseño experimental

Con el fin de obtener la variación de los parámetros del modelo cinético presentado en las ecuaciones (88)–(94), se diseñaron experimentos concernientes al sistema con el fin de ajustar los valores de los parámetros en las ecuaciones planteadas.

Gracias a que el modelo no está descrito por ecuaciones algebraicas, sino diferenciales ordinarias, este caso se diferencia de un caso convencional de cinética enzimática en donde se observan directamente los valores de velocidad de reacción manipulando las concentraciones de reactivos. En estos casos las variables manipuladas son las concentraciones iniciales de reactivos y parámetros externos que no cambien con el tiempo, de tal manera que estos corresponden a los factores del diseño experimental [102].

En la aplicación particular de este trabajo, se designaron como factores las concentraciones iniciales de trioleína y etanol, sin embargo, como la trioleína no es pura, sino que contiene diferentes acilglicéridos, cada concentración de trioleína, dio lugar a diferentes concentraciones iniciales de tri-, di- y monoglicéridos calculados según las fracciones másicas mostradas en la Tabla 7. Como parámetro externo, para cumplir con los objetivos planteados se tomó la actividad de agua de la enzima. Así entonces, se utilizó un diseño experimental 3^3 con el fin de evaluar tres factores, cada uno con tres niveles diferentes, a saber, X_1 , que se asignó al volumen de trioleína grado práctico añadido al frasco de reacción, X_2 , al volumen de etanol añadido y X_3 a la actividad de agua con la que se ha pre-equilibrado a la lipasa. Los volúmenes añadidos de trioleína y etanol dan lugar, de acuerdo con la composición de la trioleína a diferentes valores iniciales de la concentración de tri-, di- y monoglicéridos. En la Tabla 16 se presentan los valores de las variables en los tres niveles y las correspondientes concentraciones al inicio para los tres niveles de los factores y en la Tabla 17 se muestra el diseño experimental utilizado.

Tabla 16. Niveles de los factores y correspondientes concentraciones iniciales de sustratos

Nivel	Factor			c_{T0} [g/mL]	c_{D0} [g/mL]	c_{M0} [g/mL]	c_{A0} [g/mL]
	X_1	X_2	X_3				
1	5 mL	1 mL	0,577	0,1605	0,0118	0,0075	0,0316
2	10 mL	2 mL	0,753	0,3211	0,0238	0,0150	0,0631
3	15 mL	5 mL	0,843	0,4816	0,0357	0,0225	0,1578

12.2. Resultados de las corridas experimentales

En la Figura 32 se muestran dos resultados típicos entre las 27 corridas, correspondientes a las corridas 2 y 8. Estos y los demás resultados se presentan ampliados en el ANEXO II. Antes de iniciar la obtención de los parámetros cinéticos, se hizo un análisis de los datos presentes.

Tabla 17. Diseño experimental usado en la transesterificación

Número de corrida	Factores			Número de corrida	Factores			Número de corrida	Factores		
	X ₁	X ₂	X ₃		X ₁	X ₂	X ₃		X ₁	X ₂	X ₃
1	1	1	1	10	1	1	2	19	1	1	3
2	2	1	1	11	2	1	2	20	2	1	3
3	3	1	1	12	3	1	2	21	3	1	3
4	1	2	1	13	1	2	2	22	1	2	3
5	2	2	1	14	2	2	2	23	2	2	3
6	3	2	1	15	3	2	2	24	3	2	3
7	1	3	1	16	1	3	2	25	1	3	3
8	2	3	1	17	2	3	2	26	2	3	3
9	3	3	1	18	3	3	2	27	3	3	3

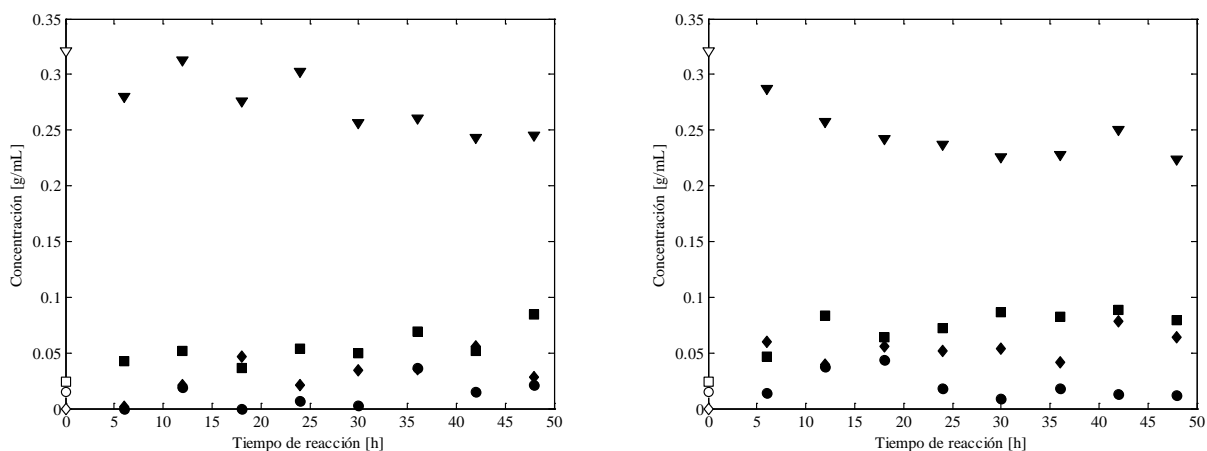


Figura 32. Seguimiento de la reacción correspondiente a las corridas 2 (derecha) y 5 (izquierda) del diseño experimental. Los datos experimentales se muestran como sigue: (▼) Triglicéridos, (■) diglicéridos, (●) monoglicéridos y (◆) biodiesel.

De manera análoga a lo desarrollado en este trabajo, Cheirsilp *et al* [38] siguieron la etanolisis de aceite de palma usando lipasa inmovilizada de *Pseudomonas sp.*, con el objetivo de evaluar la producción de biodiesel durante 48 horas aunque en condiciones libres de solvente. Los perfiles que obtuvieron en su trabajo tienen una tendencia similar a los resultados obtenidos aquí, sin embargo, los perfiles obtenidos por estos autores tienen una apariencia que sugiere que en el mismo tiempo las reacciones se han llevado a cabo en una mayor extensión. Una diferencia importante para este efecto puede ser que estos autores adicionan agua al medio de reacción, lo que impone una presencia de hidrólisis de los acilglicéridos y esterificación de los ácidos grasos libres presentes y de los formados. En este mismo sentido, Camacho *et al* [33], quienes siguieron una etanolisis de trioleína y un aceite rico en ácidos grasos poli-insaturados con lipasas inmovilizadas de *Mucor miehei* y *Rhizopus oryzae* en metil *tert*-butil éter, obtuvieron un perfil similar, sin embargo muestran una producción mayor de etil ésteres.

12.2.1. Variación de los monoglicéridos en el tiempo de reacción

Observando los datos correspondientes a las concentraciones obtenidas con la enzima pre-equilibrada en el valor más bajo de a_w (corridas 1 a 9), los datos de las concentraciones de monoglicéridos llaman la atención por ser, en todas ellas, muy similares a las concentraciones

iniciales correspondientes. Para verificar una variación significativa de estos valores se preparó la siguiente prueba estadística de los datos tomados por cada a_w mediante un test de bondad del ajuste χ^2 ejecutando el comando *chi2gof* de Matlab® en donde se distribuyó la función de probabilidad en 10 partes:

- H_0 : Los valores $c_M(t_j) - c_{M0}$ están distribuidos normalmente con media desconocida y varianza desconocida
 H_1 : Los valores $c_M(t_j) - c_{M0}$ no están distribuidos normalmente

Los resultados del test estadístico se muestran en la Tabla 18. Estos muestran que para el primer nivel de a_w no se puede rechazar la hipótesis nula haciendo su variación no significativa, con lo que se presume que para estos datos el tercer paso del mecanismo (ecuación (37)) no se lleva a cabo, bien sea por un muy corto tiempo de reacción, que las reacciones de producción y desaparición de monoglicéridos, o porque intrínsecamente este paso no se lleve a cabo. Para los otros niveles de a_w si se observaron variaciones significativas, por lo que se tuvo en cuenta todo el modelo.

Tabla 18. Prueba de hipótesis sobre la variación de la concentración de monoglicéridos con un nivel de significancia de 5%

a_w	Resultado	ν	χ^2	p -Valor
0,577	Falla el rechazo	6	19,7225	0,0031
0,753	Rechazada	4	2,3477	0,6721
0,847	Rechazada	5	3,4109	0,6369

12.2.2. Rendimiento de biodiesel

Con el fin de observar el rendimiento de biodiesel con respecto a las concentraciones iniciales en la reacción, se graficaron las proporciones obtenidas de concentración de biodiesel al final de las mediciones frente a las concentraciones al inicio de la reacción en la Figura 33 para cada valor de a_w evaluado. Los valores de rendimientos obtenidos en este trabajo son similares a los presentados por Coggon *et al* [29] para la metanólisis de trioleína catalizada por lipasa de *Candida antarctica* comercial.

En los datos presentados en la Figura 33 muestran, que en todos los casos, en la medida en que la concentración inicial de etanol fue la mayor, se obtuvo un rendimiento mayor o igual al doble de los valores para las otras concentraciones de etanol, no obstante, en la medida en que la concentración inicial de acilglicéridos aumenta, el rendimiento de biodiesel se reduce, sugiriendo la necesidad de un tiempo de reacción más largo para alcanzar valores similares. Por su parte, para las concentraciones más pequeñas de alcohol, los rendimientos también descienden con respecto al aumento en la concentración inicial de acilglicéridos, pero con respecto al etanol presentan comportamientos ambiguos, probablemente atribuibles al error experimental, y no permiten abstraer alguna conclusión. Es muy importante el efecto de la actividad de agua, en la cual se aumenta de manera apreciable el rendimiento de biodiesel, particularmente con el valor más alto de la concentración inicial de etanol y la más baja de acilglicéridos.

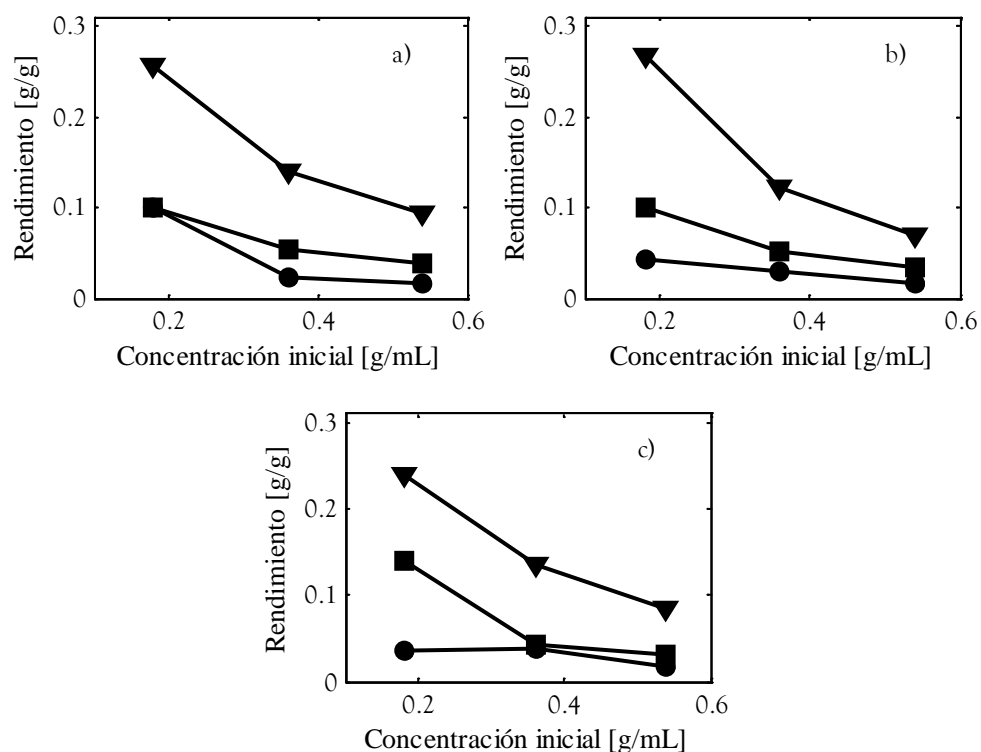


Figura 33. Rendimiento de biodiesel a acilglicéridos frente a las concentraciones iniciales de reactivos después de 48 h de reacción. a) $a_w = 0,577$; b) $a_w = 0,753$, c) $a_w = 0,847$. (▼) $c_{A0} = 0,1578$ g/mL, (■) $c_{A0} = 0,0631$ g/mL, (●) $c_{A0} = 0,0316$ g/mL

12.2.3. Conversión de triglicéridos

En la Figura 34 se presentan las conversiones de triglicéridos obtenidas para todas las corridas del diseño experimental. Un conjunto de valores de conversiones obtenidas de la literatura se mostró en la Tabla 4, los cuales varían según el tipo de lipasa usada, el tipo de aceite, el tiempo de reacción, etc. Para este caso, todas las conversiones oscilaron entre 20 y 90% como función de las variables del diseño experimental. El aumento en la actividad de agua de la lipasa mostró una clara tendencia a aumentar el valor de la conversión de los triglicéridos presentes, mientras que las concentraciones iniciales mostraron comportamientos erráticos. Es interesante observar que aunque las conversiones de triglicéridos son altas, los rendimientos de biodiesel son pequeños, lo que sugiere que la degradación de los triglicéridos por parte del etanol se emplea para producir di- y monoglicéridos, por lo que se presume que el tiempo de reacción fue muy corto para obtener mayores rendimientos a biodiesel.

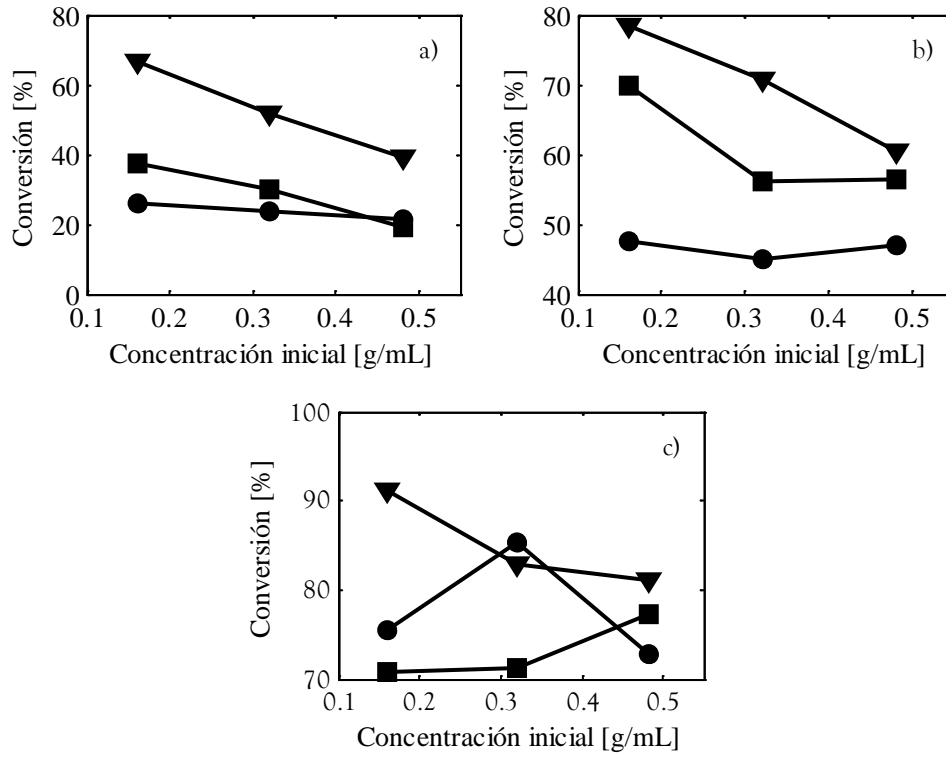


Figura 34. Conversión de triglicéridos frente a las concentraciones iniciales de acilglicéridos después de 48 h de reacción. a) $a_w = 0,577$; b) $a_w = 0,753$, c) $a_w = 0,847$. (▼) $c_{A0} = 0,1578$ g/mL, (■) $c_{A0} = 0,0631$ g/mL, (●) $c_{A0} = 0,0316$ g/mL

12.3. Ajuste de los datos experimentales

12.3.1. Función objetivo y algoritmos de minimización e integración

El ajuste de los datos se realizó mediante el software Matlab® creando una rutina para cada grupo de datos correspondientes a cada valor de a_w , llamados *Minimizacion1*, *Minimizacion2* y *Minimizacion3*. La regresión consistió en una minimización de la función objetivo (ecuación (95)), que corresponde a la suma de los cuadrados del error de cada promedio de medida.

$$FO(\beta) = \sum_{i=1}^{N_{corrida}} \sum_{j=1}^8 \left[\left(c_T^{calc} \Big|_{t_j} - c_T^{exp} \Big|_{t_j} \right)^2 + \left(c_D^{calc} \Big|_{t_j} - c_D^{exp} \Big|_{t_j} \right)^2 + \left(c_M^{calc} \Big|_{t_j} - c_M^{exp} \Big|_{t_j} \right)^2 + \left(c_B^{calc} \Big|_{t_j} - c_B^{exp} \Big|_{t_j} \right)^2 \right] \quad (95)$$

La minimización se hace mediante el comando *lsqcurvefit*, que viene incorporado en el software Matlab® y en el que usó un algoritmo de región de confianza acondicionado con un método de Newton para optimizaciones restringidas. Para los valores de los parámetros, la búsqueda del mínimo se restringió a valores entre 0 y 100. Los valores calculados de las concentraciones medidas que requiere las rutinas *Minimizacion* y el comando *lsqcurvefit* se obtienen al integrar el sistema de ecuaciones mediante el uso de fórmulas de Runge-Kutta con un par Dormand-Prince de órdenes 4 y 5, con adaptación del tamaño de paso que viene implementado en el comando *ode45* y que

hace parte de Matlab®. Todas las rutinas mencionadas que no son parte integral del software se encuentran en el ANEXO I.

12.3.2. Resultados de los parámetros y variación con la actividad de agua

Una vez regresados los parámetros, se utilizó el comando *nlparci* para obtener un intervalo con el 95% de confianza para el valor obtenido de cada uno de ellos. Este comando calcula los intervalos mediante una forma comúnmente usada para regresiones no lineales [102-104], en la que se realiza una estimación de la varianza de los parámetros usando las derivadas del modelo con respecto a los parámetros. Los resultados para los parámetros y sus intervalos de confianza para los diferentes valores de a_w se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros regresados e intervalos de confianza al 95%

a_w	Valor	Parámetro										
		β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_6	β_7	β_8	β_9	β_{10}	β_{11}
0,577	μ_β	0,2350	0,0937	0,5374	6,4194	$5,23 \cdot 10^{-12}$	0,6148	27,0824	$3,42 \cdot 10^{-9}$	0,0051	$2,22 \cdot 10^{-14}$	$4,11 \cdot 10^{-6}$
	σ_β^2	$5,38 \cdot 10^{-4}$	$3,81 \cdot 10^{-4}$	$1,07 \cdot 10^{-3}$	$5,09 \cdot 10^{-4}$	$8,84 \cdot 10^{-4}$	$7,82 \cdot 10^{-4}$	$5,30 \cdot 10^{-4}$	$5,19 \cdot 10^{-4}$	1,8984	$5,40 \cdot 10^{-4}$	0,0500
	$\Delta\beta$	0,0457	0,0384	0,0644	0,0444	0,0585	0,0550	0,0453	0,0448	2,7123	0,0457	0,4401
	β_{sup}	0,2807	0,1321	0,6018	6,4638	0,0585	0,6698	27,1277	0,0448	-2,7072	-0,0457	-0,4401
	β_{inf}	0,1893	0,0553	0,4730	6,3750	-0,0585	0,5598	27,0824	-0,0448	2,7174	0,0457	0,4401
0,753	β	0,7623	0,1695	0,0399	8,0631	4,2430	1,5095	44,4715	3,7630	$5,08 \cdot 10^{-3}$	$2,22 \cdot 10^{-14}$	$4,11 \cdot 10^{-6}$
	σ_β^2	$6,63 \cdot 10^{-4}$	$3,61 \cdot 10^{-4}$	$2,31 \cdot 10^{-3}$	$7,33 \cdot 10^{-4}$	$5,44 \cdot 10^{-3}$	0,0107	$3,97 \cdot 10^{-4}$	$9,90 \cdot 10^{-4}$	$3,67 \cdot 10^{-4}$	$5,89 \cdot 10^{-3}$	$1,93 \cdot 10^{-3}$
	$\Delta\beta$	0,0507	0,0374	0,0947	0,0533	0,1452	0,2040	0,0392	0,0619	0,0377	0,1511	0,0866
	β_{sup}	0,8130	0,2069	0,1346	8,1164	4,3882	1,7141	44,5107	3,8249	0,0377	0,1511	0,0866
	β_{inf}	0,7116	0,1321	-0,0548	8,0098	4,0978	1,3045	44,4323	3,7011	-0,0376	-0,1511	-0,0866
0,843	β	0,0990	0,0214	$1,22 \cdot 10^{-5}$	0,3576	$3,23 \cdot 10^{-12}$	0,3958	17,3846	$2,97 \cdot 10^{-14}$	3,8163	$2,36 \cdot 10^{-12}$	9,0477
	σ_β^2	$1,02 \cdot 10^{-3}$	$1,18 \cdot 10^{-3}$	$6,19 \cdot 10^{-4}$	$2,02 \cdot 10^{-4}$	$8,99 \cdot 10^{-4}$	$1,66 \cdot 10^{-4}$	$9,27 \cdot 10^{-4}$	$3,73 \cdot 10^{-4}$	$1,44 \cdot 10^{-3}$	$3,58 \cdot 10^{-10}$	$1,30 \cdot 10^{-3}$
	$\Delta\beta$	0,0629	0,0676	0,0490	0,0280	0,0590	0,0253	0,0599	0,0380	0,0748	$7,05 \cdot 10^{-10}$	0,0711
	β_{sup}	0,1619	0,0890	0,0490	0,3856	0,0590	0,4211	17,4445	0,0380	3,8911	$7,07 \cdot 10^{-10}$	9,1188
	β_{inf}	0,0361	-0,0462	-0,0490	0,3296	-0,0590	0,3705	17,3247	-0,0380	3,7415	$-7,03 \cdot 10^{-10}$	8,9766

Los resultados de los intervalos muestran inferencias importantes sobre el comportamiento de la reacción. En particular, el parámetro β_{10} , que contiene las constantes asociadas en el mecanismo con la capacidad de enlace entre la lipasa acilada y el etanol (ecuación (55)) se ajustó a valores muy cercanos a cero con intervalos de confianza mayores por varios órdenes de magnitud y que pasan de negativo a positivo. Esto podría indicar que la etapa de la reacción correspondiente a la ecuación (38) no se llevó a cabo por falta de tiempo en la reacción o por ser una etapa muy rápida en el mecanismo. Esta última es una de las suposiciones implícitas en el mecanismo que mejor se ajustó en el trabajo de Cheirsilp *et al* [38]. Esta suposición llevó en ese trabajo a una ausencia de términos en el denominador para combinaciones acilglicérido – etanol ($c_T c_A$, $c_D c_A$ y $c_M c_A$), lo que resulta interesante en los resultados obtenidos aquí, ya que β_5 y β_9 que representan las interacciones $a_T a_A$ y $a_M a_A$, se ajustaron con valores cercanos a cero e intervalos de confianza que pasan de negativo a positivo para la primera actividad de agua. A diferencia de estos últimos, el

parámetro β_7 , que contiene la interacción entre diglicéridos y etanol, presenta unos valores altos y confiables.

El parámetro β_{11} , que contiene la constante de inhibición, también tuvo las mismas características que β_{10} , para las primeras actividades de agua, lo que sugiere que las concentraciones usadas de etanol no son lo suficientemente altas para permitir evaluar esta inhibición, o que en realidad no se presenta durante esta reacción o este solvente. Esta es una de las ventajas que se le ha atribuido al uso de este tipo de medios en reacciones enzimáticas de producción de biodiesel [23, 105].

La actividad de agua presentó un efecto importante sobre los valores de las constantes mostradas en la Tabla 19. A partir de la definición del vector β (ecuación (87)) se calcularon los correspondientes valores de las constantes cinéticas de la ecuación y se presentan en la Figura 35. Allí se puede observar que el valor de la velocidad máxima de la reacción de consumo de tri-, V_{mT} , y diglicéridos, V_{mD} , presentan un aumento y luego una disminución, indicando un punto de actividad de agua donde se presenta un máximo, a diferencia de la velocidad máxima de consumo de monoglicéridos, V_{mM} , que presenta una disminución con el aumento del valor de actividad de agua.

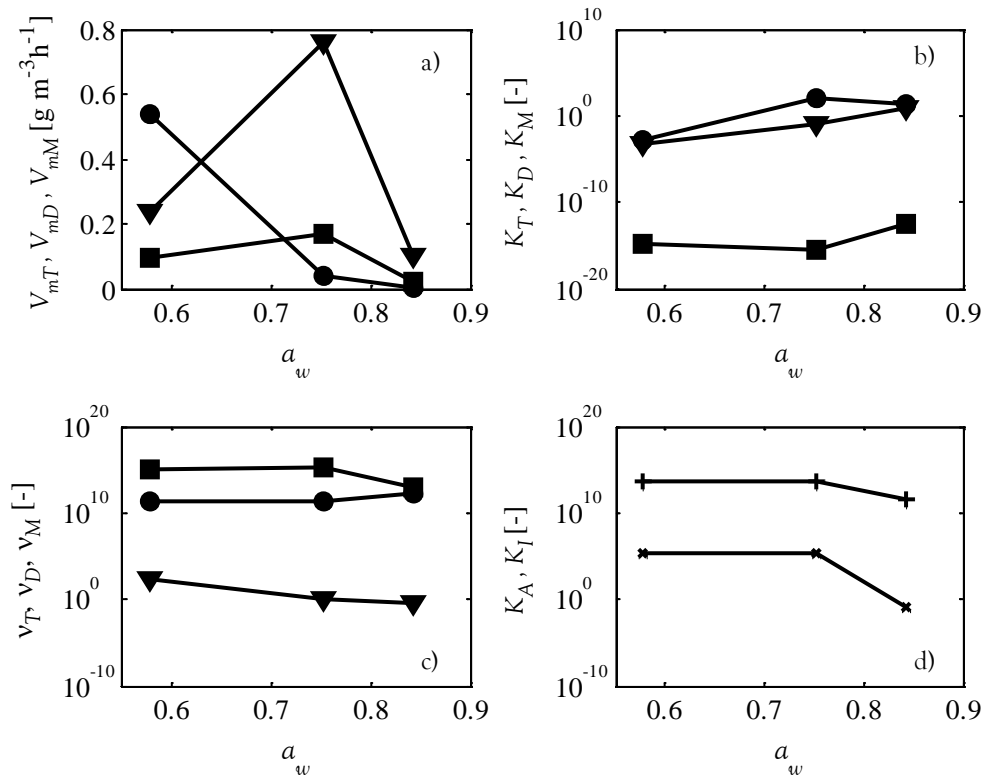


Figura 35. Variación de los parámetros de la cinética en función de la actividad de agua: a) V_{mT} (∇), V_{mD} (\blacksquare), V_{mM} (\bullet); b) K_T (∇), K_D (\blacksquare), K_M (\bullet); c) v_T (∇), v_D (\blacksquare), v_M (\bullet); d) K_A (+), K_I (\times).

Una presencia de un máximo en la velocidad inicial de reacción con respecto a la actividad de agua también fue reportado para una transesterificación entre decanoato de etilo y n-hexanol usando lipasa de *Candida rugosa*, aunque inmovilizada en polipropileno, arrojando como valores óptimos

de $a_w=0,53$ [106]. Sin embargo, también se ha reportado que este valor óptimo para *Candida rugosa* varía de acuerdo con los diferentes soportes en que se encuentre inmovilizada [107]. Por otro lado, Camacho *et al* [33] quienes añadieron agua al medio de reacción no a través de equilibración de la lipasa, sino directamente en el medio, encontraron un aumento en la cantidad de monoglicéridos producidos con un aumento en la cantidad de agua, lo que tiene una tendencia contraria a lo mostrado aquí.

De otro lado, las constantes v_T , v_D y v_M , que se definieron en las ecuaciones (78), (80) y (82), presentan valores de varios órdenes de magnitud, indicando que el paso representado en la ecuación (38) resulta muy rápido comparado con los pasos correspondientes a la degradación de los acilglicéridos. Esto como se mencionó antes, es comparable a lo mencionado por Cheirsilp *et al* [38], y concuerda con las observaciones experimentales. El alto valor de K_A sugiere que el tiempo de reacción no fue suficiente para obtener mayores rendimientos de biodiesel, ya que no fue suficiente el tiempo para la degradación de los acilglicéridos.

12.3.3. Análisis de los residuales

Con el objetivo de evaluar la bondad del ajuste y los diferentes parámetros entre ellos, se realizaron diferentes planteamientos sobre el comportamiento de los residuales del modelo:

- *Los residuales están distribuidos normalmente.* Se plantea rechazar la hipótesis nula de una distribución normal de los residuos para cada valor de a_w con varianzas y medias desconocidas frente a la alternativa de no estar distribuidos normalmente. Ya que el número de muestras es alto (288 residuales por cada a_w) se usó un test de bondad del ajuste χ^2 ejecutando el comando *chi2gof*, en donde se distribuyó la función de probabilidad en 10 partes. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Prueba de la hipótesis de distribución normal de los residuales del modelo con 5 % de nivel de significancia

a_w	Resultado	v	χ^2	p -Valor
0,577	No rechazada	4	6,1512	0,1881
0,753	No rechazada	5	10,9193	0,0530
0,847	No rechazada	5	8,2351	0,1437

Estos resultados indicaron que con un nivel de significancia del 5% los residuales se encuentran distribuidos normalmente para todos los valores de actividad de agua, sin embargo, como los p -valores son tan cercanos a 0,05 el resultado no fue tomado como contundente.

- *La distribución de los residuales tiene media cero.* Para verificar el comportamiento de los mismos se probó si su distribución tiene una media igual a cero, de tal manera que se plantea rechazar la hipótesis nula de una media igual a cero frente a una alternativa diferente de cero. Como no se conoce la varianza poblacional de los residuales se utiliza un test de t -Student para la prueba ejecutado por el comando *ttest* del software Matlab®. Los resultados se muestran en la Tabla 21. Estos resultados muestran que en todas las pruebas

se rechaza la hipótesis de una media cero, lo que puede indicar una variación frente a las variables del diseño experimental.

Tabla 21. Prueba de hipótesis con 5% de significancia sobre la media de los residuales para cada valor de a_w

a_w	Resultado	S_e	ν	$t_{1-\alpha/2, \nu}$	p -Valor
0,577	Rechazada	0,0306	287	-7,3855	0,0000
0,753	Rechazada	0,0292	287	-3,7416	0,0002
0,847	Rechazada	0,0316	287	2,3455	0,0197

- La media de los residuales no se ve afectada por la concentración inicial de trioleína o de etanol. Para este propósito se graficaron los valores absolutos de la media de los residuales en cada punto del diseño experimental frente a los valores de concentración inicial de trioleína y etanol en la Figura 36.

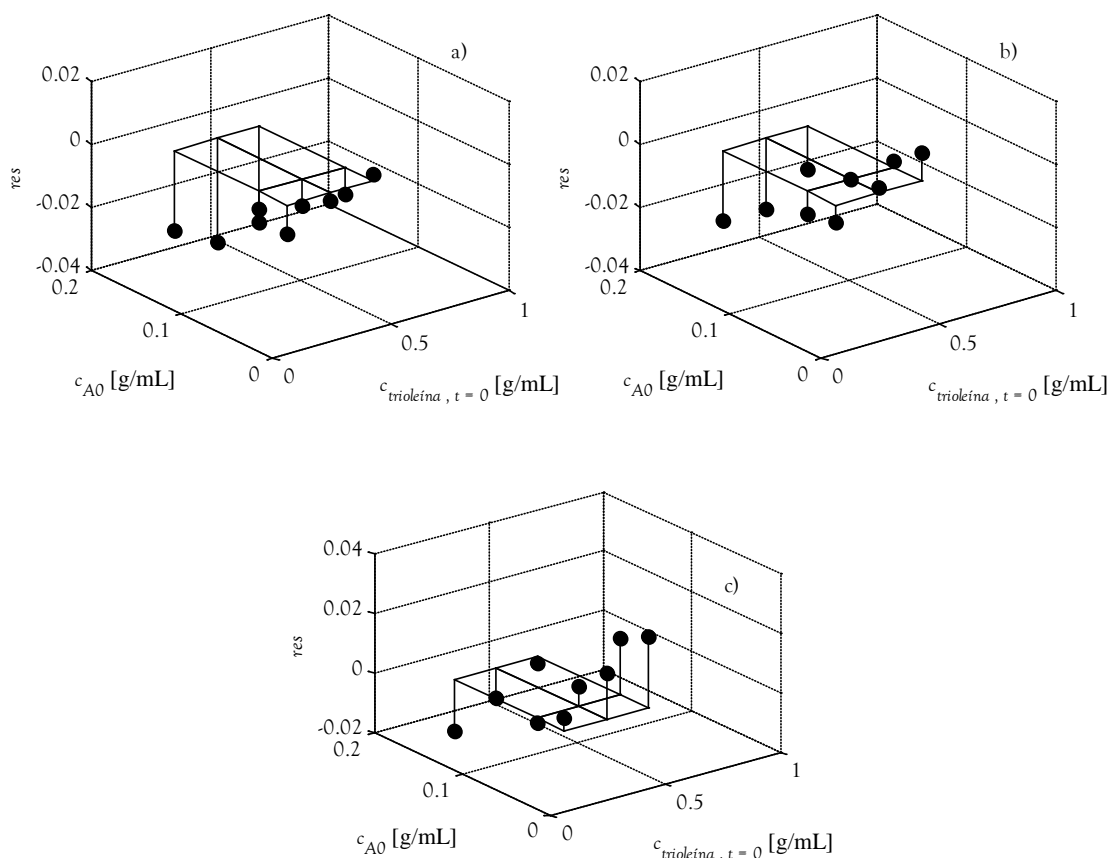


Figura 36. Valor absoluto de la media de los residuales para el diseño experimental vs las concentraciones iniciales de los reactivos y los productos: a) $a_w = 0,577$; b) $a_w = 0,753$; c) $a_w = 0,847$

Se observó que el promedio de los residuales para todos los tiempos y sustancias de todas las corridas tienden a aumentar con el aumento en las concentraciones iniciales de trioleína como de etanol. Esto sumado al hecho de haber obtenido intervalos de confianza de los parámetros que

pasan de negativo a positivo, y en particular con varios órdenes de magnitud de diferencia frente al valor del parámetro, suele indicar una complejidad innecesaria en el modelo utilizado [102-104], sin embargo, estas falencias se creen atribuibles a que los datos experimentales no muestran unos perfiles completamente desarrollados en el tiempo de reacción seleccionado, de tal manera que el modelo pierde la capacidad de describir este comportamiento adecuadamente.

12.4. Predicción y comparación de pruebas usando isooctano como solvente

Con el fin de evaluar la cinética se tomaron en consideración dos pruebas de reacción usando isooctano como solvente. Se seleccionaron las condiciones correspondientes a las corridas 12 y 23 para las pruebas experimentales, ya que se considera que el modelo presenta una buena predicción de los datos en n-hexano. En la Figura 37 se muestran los resultados experimentales y las predicciones para la corrida 12. En este caso los datos experimentales se encontraron que los datos experimentales de concentración concordaron para el modelo planteado. Sin embargo, en la Figura 38, donde se muestran los datos para la corrida 23, se observan algunas desviaciones para el perfil de concentración de triglicéridos, mientras que para los demás acilglicéridos y biodiesel, el modelo predijo adecuadamente los datos obtenidos.

Adicionalmente, en la Tabla 22 se presenta una comparación entre los valores de la conversión y el rendimiento de las dos corridas en ambos solventes. Se puede apreciar cómo la conversión en ambas corridas aumentó con respecto al valor de la conversión en n-hexano. Un aumento en este mismo aspecto fue reportado para la metanólisis de aceite de semilla de *Jathropha curcas* usando lipasa comercial de *Candida antarctica* a 45°C en 4 h de reacción [27], aunque los valores de las conversiones reportados son mucho más bajas (5,5% para n-hexano y 8,8% para isooctano). Por el contrario, se ve un gran aumento en los rendimientos de producción de biodiesel por gramo de acilglicéridos iniciales para ambas corridas.

Tabla 22. Conversión y rendimiento de la reacción con n-hexano e isooctano como solventes

Corrida	a_w	c_{TO} [g/mL]	c_{AO} [g/mL]	Hexano		Isooctano	
				Conversión [%]	Rendimiento [g/g]	Conversión [%]	Rendimiento [g/g]
12	0,753	0,4816	0,0316	46,91	0,0163	52,92	0,2350
23	0,843	0,3211	0,0631	71,14	0,0417	72,60	0,4093

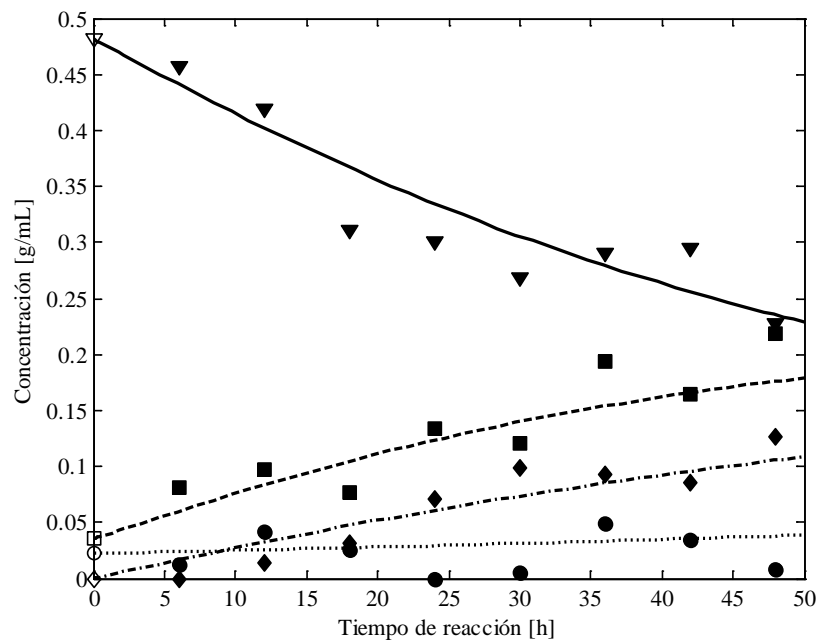


Figura 37. Datos experimentales y datos predichos por el modelo para la reacción con isooctano como solvente replicando las condiciones de la corrida 12 del diseño experimental. Los datos experimentales se muestra como sigue: (▼) Triglicéridos, (■) diglicéridos, (●) monoglicéridos y (◆) biodiesel. Las predicciones del modelo se trazaron mediante líneas: (—) Triglicéridos, (---) diglicéridos, (···) monoglicéridos y (-·-) biodiesel.

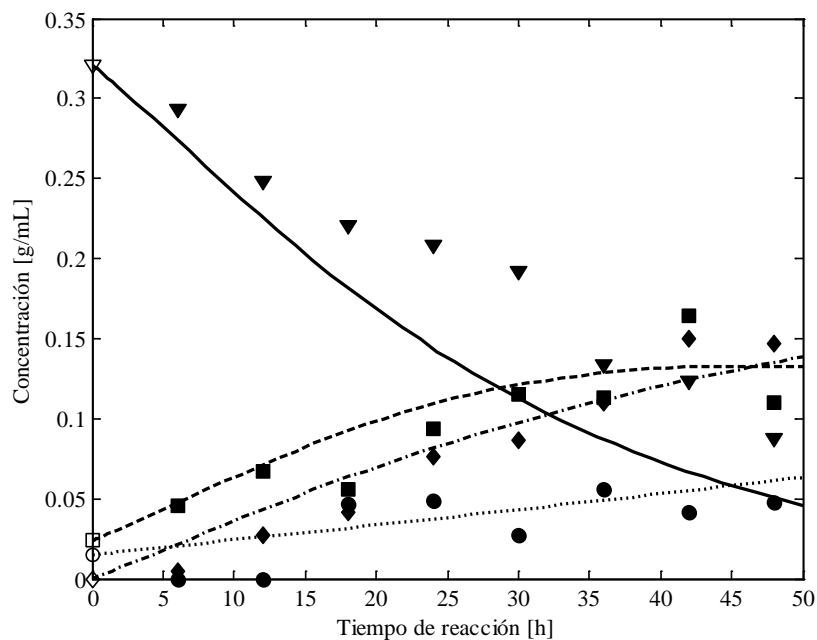


Figura 38. Datos experimentales y datos predichos por el modelo para la reacción con isooctano como solvente replicando las condiciones de la corrida 23 del diseño experimental. Los datos experimentales se muestra como sigue: (▼) Triglicéridos, (■) diglicéridos, (●) monoglicéridos y (◆) biodiesel. Las predicciones del modelo se trazaron mediante líneas: (—) Triglicéridos, (---) diglicéridos, (···) monoglicéridos y (-·-) biodiesel.

13. CONCLUSIONES

El modelo UNIFAC con los parámetros ajustados por [78] para acilglicéridos mostró un pobre desempeño en cuanto a los datos para trioleína presentados en [88]. Esto demuestra que el modelo UNIFAC es un modelo exploratorio que debe ser utilizado con cuidado y que, cálculos basados en él sin tener en cuenta datos experimentales, pueden dar lugar a apreciaciones erróneas del comportamiento no solo cuantitativa sino cualitativamente. Por su parte, el modelo NRTL que requiere de datos experimentales para su uso, muestra por consiguiente un comportamiento más ajustado a los datos experimentales de diversas proveniencias. Desafortunadamente, no se encontraron parámetros publicados para diglicéridos y monoglicéridos que permitan una regresión completa de todos ellos, por lo que el modelo NRTL no se pudo aplicar para el desarrollo de las cinéticas de reacción.

La revisión de las posibilidades de aplicación de cinéticas en función de actividades termodinámicas para sistemas enzimáticos llevó a la identificación de las suposiciones necesarias para el desarrollo de un modelo cinético para la transesterificación de aceites con etanol, tomando en cuenta las observaciones del mecanismo de reacción, adaptándolos a este caso en particular. El modelo fue implementado para su uso.

Usando un diseño experimental que tomaba en cuenta diferentes concentraciones de partida, se obtuvieron los registros en el tiempo de cómo varían experimentalmente las concentraciones de tri-, di- y monoglicéridos, así como de biodiesel para la muestra de trioleína grado práctico. Los resultados de las corridas experimentales con n-hexano mostraron una influencia importante de la actividad de agua sobre la reacción, ya que a mayor actividad de agua, la reacción tuvo un mayor rendimiento de producción de biodiesel y una mayor conversión de triglicéridos.

Con estos datos se ajustaron los parámetros del modelo que permitieron una evaluación de su variación desde el mecanismo propuesto. Se encontraron dificultades para cuantificar los efectos de la inhibición por alcohol, y se encontraron valores en los parámetros cinéticos que sugirieron una conversión de acil enzima a biodiesel más rápida que los pasos intermedios de degradación de los acilglicéridos. Se encontraron falencias en el modelo, que se presume se deben a la falta de un tiempo de reacción que permita desarrollar unos perfiles más completos que incluyan todos los efectos previstos. A pesar de esto, la predicción no se desvió en gran medida del comportamiento de los datos.

Al realizar las pruebas experimentales seleccionadas usando como solvente isooctano se observó un efecto importante en la reacción. La conversión y el rendimiento de biodiesel aumentaron en ambas corridas, es decir, con valores diferentes de actividad de agua, al cambiar el solvente. El modelo ajustado presentó una buena capacidad de predicción de los datos experimentales con isooctano, excepto para la representación del comportamiento de los triglicéridos en una de las corridas.

A pesar de las falencias del modelo, este resultó adecuado para la descripción de la transesterificación de trioleína con etanol usando lipasa que proviene del hongo *Candida rugosa*

tanto en n-hexano como en isooctano, sin embargo, la hipótesis planteada requiere de más ensayos y modificaciones en las condiciones de reacción para ser debidamente aceptada o refutada. Hasta el momento, se considera aceptada la hipótesis, en la medida en que se obtuvo el modelo, y este describió los comportamientos al menos de manera cualitativa y sin alejarse fuertemente de los datos experimentales, y fue capaz de predecir con un buen ajuste los comportamientos en otro solvente en dos condiciones diferentes de actividad de agua.

14. RECOMENDACIONES

La evaluación de propiedades fisicoquímicas, y en particular los coeficientes de actividad, es un paso de gran ayuda en el diseño de procesos productivos, y como se mostró, también constituyen una base para conocer otros fenómenos y mecanismos físicos. En la medida en que los procesos de producción de biodiesel están y seguirán en auge en nuestro país, es necesario estudiar los coeficientes de actividad de sustancias como tri-, di- y monoglicéridos, ésteres de ácidos grasos, etc., así como su relación con otras sustancias (p. ej., etanol, solventes). Esto se puede lograr a través de diversas formas (equilibrios líquido-líquido, presiones de vapor de soluciones, equilibrios sólido - líquido, cromatografías, etc.) que permitan una descripción adecuada y que cimente el desarrollo de procesos de producción basados en oleoquímica, donde el país está poniendo un gran énfasis. En este sentido, para este trabajo resultaría particularmente útil la realización de experimentos de presión de vapor entre trioleína y etanol, trioleína y otros solventes, así como de dioleína, monooleína, otros triglicéridos simples y mixtos, diglicéridos con diferentes ácidos grasos, etc.

Resulta particularmente importante para el desarrollo de cinéticas de reacción, una descripción a nivel molecular de los catalizadores para establecer mecanismos más acordes con los datos experimentales. En este trabajo se desarrollaron expresiones basadas en mecanismos generales de serina proteasas cambiando el solvente y la actividad de agua de la lipasa, sin embargo, poder observar el comportamiento de las moléculas de las lipasas puestas en diferentes solventes y con diferentes actividades de agua serían un punto clave para la comprensión de cómo mejorar su productividad. En este sentido, se pueden considerar estudios de la conformación tridimensional de las lipasas con diferentes solventes, tanto experimentales (usando cromatografía de rayos X, etc.) como estudios *in silico* para comprender mejor este fenómeno. Para un trabajo como el realizado aquí, sería de gran utilidad esta comprensión del comportamiento de las isoformas de la lipasa de *Candida rugosa* con respecto a las variables mencionadas. Lo anterior también trae a colación el problema de la separación y concentración de las lipasas, que podría ayudar a mejorar los rendimientos de las reacciones.

La lipasa de *Candida rugosa* usada en este trabajo se describió por parte del proveedor con un valor de actividad enzimática muy pequeño comparados con otras lipasas comerciales, lo que presumiblemente se deba a una presencia de muy pocas moléculas de lipasa. Para tal fin, es necesario estudiar procesos de concentración de (p. ej., mediante cromatografía) que mejoren su desempeño.

Es necesario desarrollar un estudio similar a este con lipasas inmovilizadas en algunos soportes, ya que es bien sabido que la inmovilización permite una reutilización en los procesos de producción que involucran enzimas. La inmovilización *per se* es un campo que abre un mundo de posibilidades para el desarrollo de procesos biocatalíticos, y que en el caso de biodiesel, pueden ser de gran utilidad para la economía del proceso. Así mismo, continuar estudios de esta naturaleza con otro tipo de solventes puede ser de gran impacto para el futuro de la producción de biodiesel, particularmente solventes de alcoholes terciarios y mezclas de solventes comunes y alcoholes

terciarios han mostrado una gran afinidad con diferentes lipasas y han mostrado un desempeño superior a los solventes tradicionales. Otros medios de reacción como los fluidos supercríticos o los líquidos iónicos también pueden ser incluidos en estudios de esta naturaleza para evaluar la viabilidad de la producción en ellos.

En particular en el desarrollo de este trabajo, algunas técnicas que mejoren los ajustes estadísticos de los modelos propuestos también pueden llevar a datos más concluyentes sobre la adecuación, o incluso, la variación de los parámetros cinéticos con efectos del medio de reacción. Una propuesta interesante usada en pocas ocasiones en cinéticas enzimáticas es el uso de diseños experimentales secuenciales que propongan nuevos valores de las variables manipuladas que tienden a reducir las varianzas de los parámetros, y por consiguiente sus incertidumbres estadísticas.

15. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.C. Vera Díaz, Política Estatal sobre Biocombustibles, in, Ministerio de Minas y Energía - República de Colombia, Sitio web: <http://www.minminas.gov.co/minminas/downloads/UserFiles/File/hidrocarburos/POLITICAS%20BIOCOMBUSTIBLES.TIF>, 2009.
- [2] C.N.d. Planeación, Documento Conpes 3510: Lineamientos de Política para Promover la Producción Sostenible de Biocombustibles en Colombia, in, Ministerio de Minas y Energía / Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural / Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial / Ministerio de Comercio, Industria y Turismo / Ministerio de Protección Social / Ministerio de Hacienda y Crédito Público / Ministerio de Transporte / Colciencias Sitio web: <http://www.minminas.gov.co/minminas/downloads/UserFiles/File/hidrocarburos/Biocombustible/Conpes203510.pdf>, 2008.
- [3] M.I. Montoya Rodríguez, Evaluación Integral de la Eficiencia Económica y Ambiental de Procesos para la Obtención de Biodiesel, in: Departamento de Ingeniería Química, vol. Tesis para optar al título M.Sc., Universidad Nacional de Colombia - Sede Manizales, Manizales, Caldas, 2008.
- [4] H. Lawson, Food Oils and Fats. Technology, Utilization, and Nutrition, Aspen Publishers, Inc., 1994.
- [5] W. Tsuzuki, R. Nagata, R. Yunoki, M. Nakajima, T. Nagata, cis/trans-Isomerisation of triolein, trilinolein and trilinolenin induced by heat treatment, Food Chemistry, 108 (2008) 75-80.
- [6] O.R. Fennema, Food Chemistry, 3rd ed., Marcel Dekker, Inc., New York - NY, USA, 2000.
- [7] F. Ma, M.A. Hanna, Biodiesel production: a review, Bioresource Technology, 70 (1999) 1-15.
- [8] G. Knothe, Biodiesel and renewable diesel: A comparison, Progress in Energy and Combustion Science, 36 (2010) 364-373.
- [9] J.V. Gerpen, Biodiesel processing and production, Fuel Processing Technology, 86 (2005) 1097-1107.
- [10] M.A. Kalam, H.H. Masjuki, Biodiesel from palmoil-an analysis of its properties and potential, Biomass and Bioenergy, 23 (2002) 471-479.
- [11] S. Hari Krishna, N.G. Karanth, Lipases and Lipase-Catalyzed Esterification Reactions in Nonaqueous Media, Catalysis Reviews: Science and Engineering, 44 (2002) 499 - 591.
- [12] M. Cygler, J.D. Schrag, Structure and conformational flexibility of Candida rugosa lipase, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1441 (1999) 205-214.

- [13] J. Pleiss, M. Fischer, R.D. Schmid, Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chemistry and Physics of Lipids*, 93 (1998) 67-80.
- [14] U.T. Bornscheuer, Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis, *FEMS Microbiology Reviews*, 26 (2002) 73-81.
- [15] K.-E. Jaeger, B.W. Dijkstra, M.T. Reetz, Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases, *Annual Review of Microbiology*, 53 (1999) 315-351.
- [16] F. Secundo, G. Carrea, C. Tarabiono, P. Gatti-Lafranconi, S. Brocca, M. Lotti, K.-E. Jaeger, M. Puls, T. Eggert, The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39 (2006) 166-170.
- [17] P. Domínguez de María, J.M. Sánchez-Montero, J.V. Sinisterra, A.R. Alcántara, Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview, *Biotechnology Advances*, 24 (2006) 180 - 196.
- [18] P. Domínguez de María, J.V. Sinisterra, J.M. Sánchez-Montero, M. Lotti, F. Valero, A.R. Alcántara, Acyl transfer strategy for the biocatalytical characterisation of *Candida rugosa* lipases in organic solvents, *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (2006) 199-208.
- [19] N. López, M.A. Pernas, L.M. Pastrana, A. Sánchez, F. Valero, M.L. Rúa, Reactivity of Pure *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in Aqueous and Organic Media. Influence of the Isoenzymatic Profile on the Lipase Performance in Organic Media, *Biotechnology Progress*, 20 (2004) 65-73.
- [20] C. Otero, M. Fernández-Pérez, J. Pérez-Gil, Effects of interactions with micellar interfaces on the activity and structure of different lipolytic isoenzymes from *Candida rugosa*, *Enzyme and Microbial Technology*, 37 (2005) 695-703.
- [21] P. Grochulski, Y. Li, J.D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, Insights into Interfacial Activation from an Open Structure of *Candida rugosa* Lipase, *The Journal of Biological Chemistry*, 268 (1993) 12843 - 12847.
- [22] M. Cygler, P. Grochulski, R.J. Kazlauskas, J.D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A.N. Serreqi, A.K. Gupta, A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 3180-3186.
- [23] M. Szczesna Antczak, A. Kubiak, T. Antczak, S. Bielecki, Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process, *Renewable Energy*, 34 (2009) 1185-1194.
- [24] Z. Helwani, M.R. Othman, N. Aziz, W.J.N. Fernando, J. Kim, Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review, *Fuel Processing Technology*, 90 (2009) 1502-1514.

- [25] S. Al-Zuhair, F.W. Ling, L.S. Jun, Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase, *Process Biochemistry*, 42 (2007) 951-960.
- [26] V. Dossat, D. Combes, A. Marty, Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil, *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (2002) 90-94.
- [27] E. Su, D. Wei, Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55 (2008) 118-125.
- [28] C.J. Shieh, H.F. Liao, C.C. Lee, Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology, *Bioresource Technology*, 88 (2003) 103-106.
- [29] R. Coggon, P.T. Vasudevan, F. Sanchez, Enzymatic transesterification of olive oil and its precursors, *Biocatalysis and Biotransformation*, 25 (2007) 135 - 143.
- [30] W. Du, D. Liu, L. Li, L. Dai, Mechanism Exploration during Lipase-Mediated Methanolysis of Renewable Oils for Biodiesel Production in a tert-Butanol System, *Biotechnol. Prog.*, 23 (2007) 1087-1090.
- [31] M. Kaieda, T. Samukawa, A. Kondo, H. Fukuda, Effect of Methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91 (2001) 12-15.
- [32] W. Piyatheerawong, Y. Iwasaki, X. Xu, T. Yamane, Dependency of water concentration on ethanolysis of trioleoylglycerol by lipases, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 28 (2004) 19-24.
- [33] F. Camacho, A. Robles, P.A. González, B. Camacho, L. Esteban, E. Molina, Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols, *Applied Catalysis A: General*, 301 (2006) 158-168.
- [34] B. Selmi, D. Thomas, Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (1998) 691-695.
- [35] M. Iso, B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo, S. Shrestha, Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16 (2001) 53-58.
- [36] V. Dossat, D. Combes, A. Marty, Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production, *Enzyme and Microbial Technology*, 25 (1999) 194-200.
- [37] A. Salis, M. Pinna, M. Monduzzi, V. Solinas, Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis, *Journal of Biotechnology*, 119 (2005) 291-299.

- [38] B. Cheirsilp, A. H-Kittikun, S. Limkatanyu, Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase, *Biochemical Engineering Journal*, 42 (2008) 261-269.
- [39] J.W. Tester, M. Modell, *Thermodynamics and its applications*, Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, N.J., 1997.
- [40] S.I. Sandler, *Chemical, Biochemical, and Engineering Thermodynamics*, 4TH ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2006.
- [41] C.E.C. Rodrigues, É.C.D. Reipert, A.F. de Souza, P.A.P. Filho, A.J.A. Meirelles, Equilibrium data for systems composed by cottonseed oil + commercial linoleic acid + ethanol + water + tocopherols at 298.2 K, *Fluid Phase Equilibria*, 238 (2005) 193-203.
- [42] R.G. Mortimer, Multicomponent Systems, in: *Physical Chemistry*, Academic Press, Burlington, 2000, pp. 199-254.
- [43] H. Renon, J.M. Prausnitz, Local compositions in thermodynamic excess functions for liquid mixtures, *AIChE Journal*, 14 (1968) 135-144.
- [44] A.S. Bommarius, B.R. Riebel, *Biocatalysis. Fundamentals and applications*, Wiley-VCH, Darmstadt, 2004.
- [45] A.M. Klibanov, G.P. Samokhin, K. Martinek, I.V. Berezin, A new approach to preparative enzymatic synthesis *Biotechnology and Bioengineering*, 19 (1977) 1351 - 1361.
- [46] S. Hari Krishna, Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, *Biotechnology Advances*, 20 (2002) 239-267.
- [47] A. Kumar, R.A. Gross, Candida antarctica Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature, *Biomacromolecules*, 1 (2000) 133-138.
- [48] J.M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Guisan, Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters, *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (2002) 775-783.
- [49] G.C. Sandoval, A. Marty, J.-S. Condoret, Thermodynamic activity-based enzyme kinetics: Efficient tool for nonaqueous enzymology, *AIChE Journal*, 47 (2001) 718 - 726.
- [50] E.A. Lissi, E.B. Abuin, A General Treatment for Meaningful Comparison of Rate Parameters of Enzyme-Catalyzed Reactions in Aqueous and Reverse Micellar Solutions, *Langmuir*, 16 (2000) 10084-10086.
- [51] K.-E. Jaeger, T. Eggert, Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002) 390-397.

- [52] S. Torres, G.R. Castro, Non-Aqueous Biocatalysis in Homogeneous Solvent Systems, *Food Technology and Biotechnology*, 42 (2004) 271 - 274.
- [53] G. Carrea, S. Riva, Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents, *Angewandte Chemie International Edition*, 39 (2000) 2226 - 2254.
- [54] P. Berglund, Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis, *Biomolecular Engineering*, 18 (2001) 13-22.
- [55] P.A. Fitzpatrick, A.M. Klibanov, How can the solvent affect enzyme enantioselectivity?, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 3166-3171.
- [56] E. Rubio, A. Fernandez-Mayorales, A.M. Klibanov, Effect of the solvent on enzyme regioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 695-696.
- [57] A. Zaks, A.M. Klibanov, Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 2767-2768.
- [58] E. Wehtje, J. Kaur, P. Adlercreutz, S. Chand, B. Mattiasson, Water activity control in enzymatic esterification processes, *Enzyme and Microbial Technology*, 21 (1997) 502-510.
- [59] C.R. Wescott, H. Noritomi, A.M. Klibanov, Rational Control of Enzymatic Enantioselectivity through Solvation Thermodynamics, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 10365-10370.
- [60] J.-S. Condoret, S. Vankan, X. Joulia, A. Marty, Prediction of water adsorption curves for heterogeneous biocatalysis in organic and supercritical solvents, *Chemical Engineering Science*, 52 (1997) 213-220.
- [61] R.M. De la Casa, J.M. Sanchez-Montero, J.V. Sinisterra, Water adsorption isotherm as a tool to predict the preequilibrium water amount in preparative esterification, *Biotechnology Letters*, 18 (1996) 13-18.
- [62] G. Sandoval, J.S. Condoret, P. Monsan, A. Marty, Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: Kinetic and thermodynamic arguments, *Biotechnology and Bioengineering*, 78 (2002) 313 - 320.
- [63] A.R. Khan, M.R. Riazi, Y.A. Al-Roomi, A thermodynamic model for liquid adsorption isotherms, *Separation and Purification Technology*, 18 (2000) 237-250.
- [64] M.R. Riazi, A.R. Khan, A Thermodynamic Model for Gas Adsorption Isotherms, *Journal of Colloid and Interface Science*, 210 (1999) 309-319.
- [65] J.C. Bellot, L. Choisnard, E. Castillo, A. Marty, Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification, *Enzyme and Microbial Technology*, 28 (2001) 362-369.

- [66] E. Catoni, E. Cernia, C. Palocci, Different aspects of 'solvent engineering' in lipase biocatalysed esterifications, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 105 (1996) 79-86.
- [67] M.-P. Bousquet-Dubouch, M. Graber, N. Sousa, S. Lamare, M.-D. Legoy, Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1550 (2001) 90-99.
- [68] F. Létisse, S. Lamare, M.-D. Legoy, M. Graber, Solid/gas biocatalysis: an appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1652 (2003) 27-34.
- [69] J. Ottosson, K. Hult, Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (2001) 1025-1028.
- [70] U. von Stockar, L.A.M. van der Wielen, Thermodynamics in biochemical engineering, *Journal of Biotechnology*, 59 (1997) 25-37.
- [71] T. Ke, C.R. Wescott, A.M. Klivanov, Prediction of the Solvent Dependence of Enzymatic Prochiral Selectivity by Means of Structure-Based Thermodynamic Calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 3366-3374.
- [72] J.B.A. van Tol, R.M.M. Stevens, W.J. Veldhuizen, J.A. Jongejan, J.A. Duine, Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, 47 (1995) 71 - 81.
- [73] L.B. Rockland, Saturated Salt Solutions for Static Control of Relative Humidity between 5° and 40°C, *Analytical Chemistry*, 32 (1960) 1375-1376.
- [74] C.B. Gonçalves, P.A. Pessôa Filho, A.J.A. Meirelles, Partition of nutraceutical compounds in deacidification of palm oil by solvent extraction, *Journal of Food Engineering*, 81 (2007) 21-26.
- [75] C.E.C. Rodrigues, M.M. Onoyama, A.J.A. Meirelles, Optimization of the rice bran oil deacidification process by liquid-liquid extraction, *Journal of Food Engineering*, 73 (2006) 370-378.
- [76] Z. Zhang, G.A. Hill, Ternary liquid-liquid equilibria of water, ethanol, and oleic acid, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 36 (1991) 453-456.
- [77] M. Lanza, W.B. Neto, E. Batista, R.J. Poppi, A.J.A. Meirelles, Liquid - Liquid Equilibrium Data for Reactional Systems of Ethanolysis at 298.3 K, *J. Chem. Eng. Data*, 53 (2008) 5-15.

- [78] E. Batista, S. Monnerat, L. Stragevitch, C.G. Pina, C.B. Goncalves, A.J.A. Meirelles, Prediction of Liquid-Liquid Equilibrium for Systems of Vegetable Oils, Fatty Acids, and Ethanol, *J. Chem. Eng. Data*, 44 (1999) 1365-1369.
- [79] C.E.C. Rodrigues, P.A.P. Filho, A.J.A. Meirelles, Phase equilibrium for the system rice bran oil+fatty acids+ethanol+water+[gamma]-oryzanol+tocols, *Fluid Phase Equilibria*, 216 (2004) 271-283.
- [80] C.B. Gonçalves, A.J.A. Meirelles, Liquid-liquid equilibrium data for the system palm oil + fatty acids + ethanol + water at 318.2 K, *Fluid Phase Equilibria*, 221 (2004) 139-150.
- [81] C.E.C. Rodrigues, A. Filipini, A.J.A. Meirelles, Phase Equilibrium for Systems Composed by High Unsaturated Vegetable Oils + Linoleic Acid + Ethanol + Water at 298.2 K, *J. Chem. Eng. Data*, 51 (2006) 15-21.
- [82] E. Batista, S. Monnerat, K. Kato, L. Stragevitch, A.J.A. Meirelles, Liquid-Liquid Equilibrium for Systems of Canola Oil, Oleic Acid, and Short-Chain Alcohols, *J. Chem. Eng. Data*, 44 (1999) 1360-1364.
- [83] C.E.C. Rodrigues, F.A. Silva, A. Marsaioli, A.J.A. Meirelles, Deacidification of Brazil Nut and Macadamia Nut Oils by Solvent Extraction: Liquid-Liquid Equilibrium Data at 298.2 K, *J. Chem. Eng. Data*, 50 (2005) 517-523.
- [84] C.B. Goncalves, E. Batista, A.J.A. Meirelles, Liquid-Liquid Equilibrium Data for the System Corn Oil + Oleic Acid + Ethanol + Water at 298.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, 47 (2002) 416-420.
- [85] H. Zhou, H. Lu, B. Liang, Solubility of Multicomponent Systems in the Biodiesel Production by Transesterification of *Jatropha curcas* L. Oil with Methanol, *J. Chem. Eng. Data*, 51 (2006) 1130-1135.
- [86] X. Liu, X. Piao, Y. Wang, S. Zhu, Liquid-Liquid Equilibrium for Systems of (Fatty Acid Ethyl Esters + Ethanol + Soybean Oil and Fatty Acid Ethyl Esters + Ethanol + Glycerol), *J. Chem. Eng. Data*, 53 (2008) 359-362.
- [87] C.E.C. Rodrigues, R. Antoniassi, A.J.A. Meirelles, Equilibrium Data for the System Rice Bran Oil + Fatty Acids + Ethanol + Water at 298.2 K, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 48 (2003) 367-373.
- [88] G.H. Eduljee, A.P. Boyes, Excess Gibbs energy for eight oleic acid-solvent and triolein-solvent mixtures at 318.15 K, *J. Chem. Eng. Data*, 26 (1981) 55-57.
- [89] A. Fredenslund, R.L. Jones, J.M. Prausnitz, Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures, *AIChE Journal*, 21 (1975) 1086-1099.

- [90] T. Magnussen, P. Rasmussen, A. Fredenslund, UNIFAC parameter table for prediction of liquid-liquid equilibriums, *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 20 (1981) 331-339.
- [91] U. Weidlich, J. Gmehling, A modified UNIFAC model. 1. Prediction of VLE, hE, and γ_{∞} , *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 26 (1987) 1372-1381.
- [92] H. Kuramochi, K. Maeda, S. Kato, M. Osako, K. Nakamura, S.-i. Sakai, Application of UNIFAC models for prediction of vapor-liquid and liquid-liquid equilibria relevant to separation and purification processes of crude biodiesel fuel, *Fuel*, 88 (2009) 1472-1477.
- [93] F. Secundo, G. Carrea, Lipase activity and conformation in neat organic solvents, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20 (2002) 93-102.
- [94] M. Graber, R. Irague, E. Rosenfeld, S. Lamare, L. Franson, K. Hult, Solvent as a competitive inhibitor for *Candida antarctica* lipase B, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1774 (2007) 1052-1057.
- [95] D. Bezbradica, D. Mijin, S. Siler-Marinkovic, Z. Knezevic, The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38 (2006) 11-16.
- [96] G. Sandoval, M. A., C.J.-. S., Thermodynamic Activity Based Enzyme Kinetics: Efficient Tool for Nonaqueous Enzymology, *AIChE Journal*, 47 (2001) 718 - 726.
- [97] Y. Xu, W. Du, D. Liu, Study on the kinetics of enzymatic interesterification of triglycerides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32 (2005) 241-245.
- [98] D.A. Mitchell, F. Carrière, N. Krieger, An analytical method for determining relative specificities for sequential reactions catalyzed by the same enzyme: General formulation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1784 (2008) 705-715.
- [99] K.A. Connors, *Chemical Kinetics. The Study of Reaction Rates in Solution*, VCH Publishers, Inc., New York, NY, USA, 1990.
- [100] J.B.A. van Tol, R.M.M. Stevens, W.J. Veldhuizen, J.A. Jongejan, J.A. Duine, Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, 47 (1995) 71-81.
- [101] S.B. Lee, Enzyme reaction kinetics in organic solvents: A theoretical kinetic model and comparison with experimental observations, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79 (1995) 479-484.

- [102] P. Englezos, N. Kalogerakis, Applied parameter estimation for chemical engineers, M. Dekker, New York, 2001.
- [103] D.M. Bates, D.G. Watts, Nonlinear Regression Analysis and Its Applications, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, 1988.
- [104] G.A.F. Seber, C.J. Wild, Nonlinear Regression, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2003.
- [105] A. Robles-Medina, P.A. González-Moreno, L. Esteban-Cerdán, E. Molina-Grima, Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production, *Biotechnology Advances*, 27 (2009) 398-408.
- [106] L. Ma, M. Persson, P. Adlercreutz, Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions, *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (2002) 1024-1029.
- [107] R.H. Valivety, P.J. Halling, A.D. Peilow, A.R. Macrae, Relationship between water activity and catalytic activity of lipases in organic media, *European Journal of Biochemistry*, 222 (1994) 461-466.

ANEXO I. RUTINAS COMPUTACIONALES CREADAS Y UTILIZADAS EN EL TRABAJO

```
function EvaluaciondeDatos
load ExperimentalHexano.mat

%% Gráficas de datos experimentales obtenidos (algunas)
texp = 6:6:48;
fig1 = figure('Color',[1 1 1],'PaperType','A4','PaperPosition',[0 0.1 20 4.5]);

% Corrida 2
s1f1 = subplot(1,2,1,'Parent',fig1,'FontName','Times New Roman','FontSize',10,'Box','on');
hdles = plot(0,TGexp(1,2),'kv',0,DGexp(1,2),'ks',0,MGexp(1,2),'ko',0,Esexp(1,2),'kd',...

texp,TGexp(2:end,2),'kv',texp,DGexp(2:end,2),'ks',texp,MGexp(2:end,2),'ko',texp,Esexp(2:end,2),'k
d');
set(gca,'FontName','Times New Roman','FontSize',10)
xlabel('Tiempo de reacción [h]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
ylabel('Concentración [g/mL]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
set(hdles(1:4),'MarkerFaceColor','w')
set(hdles(5:8),'MarkerFaceColor','k')

% Corrida 5
s2f1 = subplot(1,2,2,'Parent',fig1,'FontName','Times New Roman','FontSize',10,'Box','on');
hdles = plot(0,TGexp(1,5),'kv',0,DGexp(1,5),'ks',0,MGexp(1,5),'ko',0,Esexp(1,5),'kd',...

texp,TGexp(2:end,5),'kv',texp,DGexp(2:end,5),'ks',texp,MGexp(2:end,5),'ko',texp,Esexp(2:end,5),'k
d');
set(gca,'FontName','Times New Roman','FontSize',10)
xlabel('Tiempo de reacción [h]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
ylabel('Concentración [g/mL]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
set(hdles(1:4),'MarkerFaceColor','w')
set(hdles(5:8),'MarkerFaceColor','k')

%% Prueba de variación de la concentración de monoglicéridos
datosM1 = MGexp(2:end,1:9) - repmat(MGexp(1,1:9),8,1);
datosM2 = MGexp(2:end,10:18) - repmat(MGexp(1,10:18),8,1);
datosM3 = MGexp(2:end,19:27) - repmat(MGexp(1,19:27),8,1);

[h1,p1,stats1] = chi2gof(datosM1(:));
[h2,p2,stats2] = chi2gof(datosM2(:));
[h3,p3,stats3] = chi2gof(datosM3(:));

%% Rendimiento experimental de biodiesel
Cag0 = TGexp(1,:) + DGexp(1,:) + MGexp(1,:);
Cag = TGexp(end,:) + DGexp(end,:) + MGexp(end,:);
CA0 = [0.0316*ones(1,9) 0.0631*ones(1,9) 0.1578*ones(1,9)];
CB = Esexp(end,:);
fig2 = figure('Color',[1 1 1],'PaperType','A4','PaperSize',[8.268 11.69],'PaperPosition',[0.1 0.1
8 10]);

s1f2 = subplot(2,2,1,'Parent',fig2,'FontName','Times New Roman','FontSize',10,'Box','on');
hdle = plot(Cag0(1:3),CB(1:3)./Cag(1:3),'ko-',Cag0(4:6),CB(4:6)./Cag(4:6),'ks-
',Cag0(7:9),CB(7:9)./Cag(7:9),'kv-');
set(gca,'FontName','Times New Roman','FontSize',10,'XLim',[0.1 0.6],'YLim',[0 1.1])
xlabel('C_{T0}+C_{D0}+C_{M0} [g/mL]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
ylabel('C_B/(C_T+C_D+C_M) [g/g]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
set(hdle,'MarkerFaceColor','k')
text(0.5,1,'a','FontName','Goudy Old Style','FontSize',10)

s2f2 = subplot(2,2,2,'Parent',fig2,'FontName','Times New Roman','FontSize',10,'Box','on');
hdle = plot(Cag0(10:12),CB(10:12)./Cag(10:12),'ko-',Cag0(13:15),CB(13:15)./Cag(13:15),'ks-
',Cag0(16:18),CB(16:18)./Cag(16:18),'kv-');
set(gca,'FontName','Times New Roman','FontSize',10,'XLim',[0.1 0.6])
xlabel('C_{T0}+C_{D0}+C_{M0} [g/mL]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
ylabel('C_B/(C_T+C_D+C_M) [g/g]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
set(hdle,'MarkerFaceColor','k')
text(0.5,0.9,'b','FontName','Goudy Old Style','FontSize',10)
```

```

s3f2 = axes('Parent',fig2,'Position',[0.356217532467532 0.131852159468439 0.326055194805195
0.319310631229236],...
'FontName','Times New Roman','FontSize',10);
hdlc = plot(Cag0(19:21),CB(19:21)./Cag(19:21),'ko-',Cag0(22:24),CB(22:24)./Cag(22:24),'ks-
',Cag0(25:27),CB(25:27)./Cag(25:27),'kv-');
xlabel('C_{T0}+C_{D0}+C_{M0} [g/mL]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
ylabel('C_B/(C_T+C_D+C_M) [g/g]','FontName','Times New Roman','FontSize',10)
set(hdlc,'MarkerFaceColor','k')
text(0.5,2.3,'c'),'FontName','Goudy Old Style','FontSize',10)
set(gca,'XLim',[0.1 0.6],'YLim',[0 2.5])

function Minimizacion1
% Función para la minimización de los datos para aw2

%% Extraer los datos experimentales correspondientes aw = 0.753
load ExperimentalHexano.mat
Texp = TGexp(2:end,1:9); Dexp = DGexp(2:end,1:9);
Mexp = MGexp(2:end,1:9); Bexp = Esexp(2:end,1:9);
expt = [Texp(:); Dexp(:); Mexp(:); Bexp(:)];
EXPDES = [1 1 1; 2 1 1; 3 1 1; 1 2 1; 2 2 1;
3 2 1; 1 3 1; 2 3 1; 3 3 1; 1 1 2;
2 1 2; 3 1 2; 1 2 2; 2 2 2; 3 2 2;
1 3 2; 2 3 2; 3 3 2; 1 1 3; 2 1 3;
3 1 3; 1 2 3; 2 2 3; 3 2 3; 1 3 3;
2 3 3; 3 3 3];
[cA0,cF,cS] = datosiniciales(EXPDES(1:9,:));
T0 = TGexp(1,10:18); D0 = DGexp(1,1:9);
M0 = MGexp(1,10:18); B0 = Esexp(1,1:9);
inic = [T0(:); D0(:); M0(:); cA0; B0(:); zeros(9,1)];

%% Regresión de datos
% Parámetros iniciales
beta0 = [0.234980349704783 0.093719898106146 0.537223422322068 ...
6.419350972000602 0.000000000005494 0.614827834834191 ...
27.082142763193666 0.000000003457907 0.005078262579254 ...
0.000000000932617 0.000004112235065]';
[betal,resnorm1,residuals1,exitflag,output,lambda,JACOBIAN1] =...
lsqcurvefit(@lsqfun,beta0,inic(:),expt(:),zeros(11,1),100*ones(11,1),...
optimset('Display','iter','MaxIter',50,'TolFun',1e-8),cF,cS);
% Parte estadística
mse1 = resnorm1/(size(expt,1)-length(betal));
Jac1 = full(JACOBIAN1);
[Q,R] = qr(Jac1,0); Rinv = inv(R);
COVB1 = Rinv*Rinv'*mse1;
betalint = nlparci(betal,residuals1,'jacobian',Jac1);
% Almacenar los resultados
save Resultsaw1.mat betal residuals1 Jac1 COVB1 mse1 betalint

%% Graficar los datos experimentales frente a las predicciones del modelo
% Calcular para todos los puntos
try
[tcal,ccal] = ode45(@cinetica,[0 50],inic(:),[],betal,cF,cS);
catch
[tcal,ccal] = ode15s(@cinetica,[0 50],inic(:),[],betal,cF,cS);
end
Tcal = ccal(:,1:9); Dcal = ccal(:,10:18);
Mcal = ccal(:,19:27); Bcal = ccal(:,37:45);

% Para cada uno, graficar
for I = 1:9
figure('Color',[1 1 1],'PaperType','A4','PaperSize',[8.268 11.69],...
'PaperPosition',[0.1 0.1 6 4])
hdlc = plot(0,T0(I),'kv',0,D0(I),'ks',0,M0(I),'ko',0,B0(I),'kd',...
6:6:48,Texp(:,I),'kv',6:6:48,Dexp(:,I),'ks',6:6:48,Mexp(:,I),...
'ko',6:6:48,Bexp(:,I),'kd',...
tcal,Tcal(:,I),'-',tcal,Dcal(:,I),'--',tcal,Mcal(:,I),':',...
tcal,Bcal(:,I),'-');
set(gca,'FontSize',10,'FontName','Times New Roman','Box','on')
xlabel('Tiempo de reacción [h]','FontName','Times New Roman',...
'FontSize',10)

```



```

ylabel('Concentración [g/mL]', 'FontName', 'Times New Roman', ...
'FontSize', 10)
title(['Corrida #', num2str(I)], 'FontName', 'Goudy Old Style', ...
'FontSize', 12, 'FontAngle', 'italic')
set(hdle(5:8), 'MarkerFaceColor', 'k')
set(hdle(9:12), 'Color', 'k', 'LineWidth', 1.5)
end

function Minimizacion2
% Función para la minimización de los datos para aw2

%% Extraer los datos experimentales correspondientes aw = 0.753
load ExperimentalHexano.mat
Texp = TGexp(2:end, 10:18); Dexp = DGexp(2:end, 10:18);
Mexp = MGexp(2:end, 10:18); Bexp = Esexp(2:end, 10:18);
expt = [Texp(:); Dexp(:); Mexp(:); Bexp(:)];
EXPDES = [1 1 1; 2 1 1; 3 1 1; 1 2 1; 2 2 1;
3 2 1; 1 3 1; 2 3 1; 3 3 1; 1 1 2;
2 1 2; 3 1 2; 1 2 2; 2 2 2; 3 2 2;
1 3 2; 2 3 2; 3 3 2; 1 1 3; 2 1 3;
3 1 3; 1 2 3; 2 2 3; 3 2 3; 1 3 3;
2 3 3; 3 3 3];
[ca0, cF, cS] = datosiniciales(EXPDES(1:9, :));
T0 = TGexp(1, 10:18); D0 = DGexp(1, 10:18);
M0 = MGexp(1, 10:18); B0 = Esexp(1, 10:18);
inic = [T0(:); D0(:); M0(:); ca0; B0(:); zeros(9, 1)];

%% Regresión de datos
% Parámetros iniciales
beta0 = [0.654109748206677 0.146015448783941 0.059041088643246 ...
6.725534914624861 0.000000000005172 1.966043241790632 ...
27.832005626121404 0.000000002961572 0.005078780272320 ...
0.000000000000029 0.000004113185342]';
[beta2, resnorm2, residuals2, exitflag, output, lambda, JACOBIAN2] = ...
lsqcurvefit(@lsqfun, beta0, inic(:), expt(:), zeros(11, 1), 100*ones(11, 1), ...
optimset('Display', 'iter', 'MaxIter', 50, 'TolFun', 1e-8), cF, cS);
% Parte estadística
mse2 = resnorm2/(size(expt, 1)-length(beta2));
Jac2 = full(JACOBIAN2);
[Q, R] = qr(Jac2, 0); Rinv = inv(R);
COVB2 = Rinv*Rinv'*mse2;
beta2int = nlparci(beta2, residuals2, 'jacobian', Jac2);
% Almacenar los resultados
save Resultsaw2.mat beta2 residuals2 Jac2 COVB2 mse2 beta2int

%% Graficar los datos experimentales frente a las predicciones del modelo
% Calcular para todos los puntos
try
[tcal, ccal] = ode45(@cinetica, [0 50], inic(:), [], beta2, cF, cS);
catch
[tcal, ccal] = ode15s(@cinetica, [0 50], inic(:), [], beta2, cF, cS);
end
Tcal = ccal(:, 1:9); Dcal = ccal(:, 10:18);
Mcal = ccal(:, 19:27); Bcal = ccal(:, 37:45);

% Para cada uno, graficar
for I = 1:9
figure('Color', [1 1 1], 'PaperType', 'A4', 'PaperSize', [8.268 11.69], ...
'PaperPosition', [0.1 0.1 6 4])
hdlc = plot(0, T0(I), 'kv', 0, D0(I), 'ks', 0, M0(I), 'ko', 0, B0(I), 'kd', ...
6:6:48, Texp(:, I), 'kv', 6:6:48, Dexp(:, I), 'ks', 6:6:48, Mexp(:, I), ...
'ko', 6:6:48, Bexp(:, I), 'kd', ...
tcal, Tcal(:, I), '-', tcal, Dcal(:, I), '--', tcal, Mcal(:, I), ':', ...
tcal, Bcal(:, I), '-.');
set(gca, 'FontSize', 10, 'FontName', 'Times New Roman', 'Box', 'on')
xlabel('Tiempo de reacción [h]', 'FontName', 'Times New Roman', ...
'FontSize', 10)
ylabel('Concentración [g/mL]', 'FontName', 'Times New Roman', ...
'FontSize', 10)
title(['Corrida #', num2str(9+I)], 'FontName', 'Goudy Old Style', ...
'FontSize', 12, 'FontAngle', 'italic')

```

```

        set(hdle(5:8), 'MarkerFaceColor', 'k')
        set(hdle(9:12), 'Color', 'k', 'LineWidth', 1.5)
    end

function Minimizacion3
% Función para la minimización de los datos para aw2

%% Extraer los datos experimentales correspondientes aw = 0.753
load ExperimentalHexano.mat
Texp = TGexp(2:end,19:27); Dexp = DGexp(2:end,19:27);
Mexp = MGexp(2:end,19:27); Bexp = Esexp(2:end,19:27);
expt = [Texp(:); Dexp(:); Mexp(:); Bexp(:)];
EXPDES = [1 1 1; 2 1 1; 3 1 1; 1 2 1; 2 2 1;
3 2 1; 1 3 1; 2 3 1; 3 3 1; 1 1 2;
2 1 2; 3 1 2; 1 2 2; 2 2 2; 3 2 2;
1 3 2; 2 3 2; 3 3 2; 1 1 3; 2 1 3;
3 1 3; 1 2 3; 2 2 3; 3 2 3; 1 3 3;
2 3 3; 3 3 3];
[CA0,cF,cS] = datosiniciales(EXPDES(1:9,:));
T0 = TGexp(1,19:27); D0 = DGexp(1,19:27);
M0 = MGexp(1,19:27); B0 = Esexp(1,19:27);
inic = [T0(:); D0(:); M0(:); CA0; B0(:); zeros(9,1)];

%% Regresión de datos
% Parámetros iniciales
beta0 = [0.098987159007421 0.021371712980272 0.000013172299127 ...
0.357610887802741 0.000000000003289 0.395789863549295 ...
17.384161210387322 0.000000000007984 3.816312912531283 ...
0.000000000003258 9.047749823656885]';
[beta3,resnorm3,residuals3,exitflag,output,lambda,JACOBIAN3] =...
lsqcurvefit(@lsqfun,beta0,inic(:),expt(:),zeros(11,1),100*ones(11,1),...
optimset('Display','iter','MaxIter',50,'TolFun',1e-8),cF,cS);
% Parte estadística
mse3 = resnorm3/(size(expt,1)-length(beta3));
Jac3 = full(JACOBIAN3);
[Q,R] = qr(Jac3,0); Rinv = inv(R);
COVB3 = Rinv*Rinv'*mse3;
beta3int = nlparci(beta3,residuals3,'jacobian',Jac3);
% Almacenar los resultados
save Resultsaw3.mat beta3 residuals3 Jac3 COVB3 mse3 beta3int

%% Graficar los datos experimentales frente a las predicciones del modelo
% Calcular para todos los puntos
try
    [tcal,ccal] = ode45(@cinetica,[0 50],inic(:),[],beta3,cF,cS);
catch
    [tcal,ccal] = ode15s(@cinetica,[0 50],inic(:),[],beta3,cF,cS);
end
Tcal = ccal(:,1:9); Dcal = ccal(:,10:18);
Mcal = ccal(:,19:27); Bcal = ccal(:,37:45);

% Para cada uno, graficar
for I = 1:9
    figure('Color',[1 1 1],'PaperType','A4','PaperSize',[8.268 11.69],...
'PaperPosition',[0.1 0.1 6 4])
    hdle = plot(0,T0(I),'kv',0,D0(I),'ks',0,M0(I),'ko',0,B0(I),'kd',...
6:6:48,Texp(:,I),'kv',6:6:48,Dexp(:,I),'ks',6:6:48,Mexp(:,I),...
'ko',6:6:48,Bexp(:,I),'kd',...
tcal,Tcal(:,I),'--',tcal,Dcal(:,I),'--',tcal,Mcal(:,I),'-',...
tcal,Bcal(:,I),'-');
    set(gca,'FontSize',10,'FontName','Times New Roman','Box','on')
    xlabel('Tiempo de reacción [h]','FontName','Times New Roman',...
'FontSize',10)
    ylabel('Concentración [g/mL]','FontName','Times New Roman',...
'FontSize',10)
    title(['Corrida #',num2str(18+I)],'FontName','Goudy Old Style',...
'FontSize',12,'FontAngle','italic')
    set(hdle(5:8),'MarkerFaceColor','k')
    set(hdle(9:12),'Color','k','LineWidth',1.5)
end

```

```

function [CA0,CF0,CS0] = datosiniciales(design)
%Factores:
VTRI = [5 10 15]; %[mL]
VA = [1 2 5]; %[mL]
%Solvente:
VS = 25 - VTRI(design(:,1)) - VA(design(:,2)); %[mL]

%dens:      T      D      M      A      B      G      F      H
rho = [0.9210 0.9340 0.9690 0.7860 0.8700 1.2610 0.8950 0.6543]; %[g/mL]
wTRI = [0.8821 0.0653 0.0412 0.0000 0.0000 0.0000 0.0124 0.0000];
densTRI = 0.91; %[g/mL]

CF0 = VTRI(design(:,1))'*densTRI*wTRI(7)/25;
CA0 = VA(design(:,2))'*rho(4)/25;
CS0 = VS'*rho(8)/25;

function calc = lsqfun(B,inic,cF,cS)
% Función de mínimos cuadrados
texp = [0 6:6:48];
try
[t,c] = ode45(@cinetica,texp,inic,[],B,cF,cS);
catch
[t,c] = ode15s(@cinetica,texp,inic,[],B,cF,cS);
end
calc = c(2:end,[1:9 10:18 19:27 37:45]);
calc = calc(:);

function dcdt = cinetica(t,c,beta,cF,cS)
np = size(c,1)/6;
c = [reshape(c,np,6) cF cS]; %[g/mL] <np,8>
%      T      D      M      A      B      G      F      H
rho = [0.9210 0.9340 0.9690 0.7860 0.8700 1.2610 0.8950 0.6543]; %[g/mL]
MW = [885.46 621.00 356.54 46.070 310.53 92.090 282.46 86.180]; %[g/mol]

% Calculando la densidad de la mezcla
w = c./repmat(sum(c,2),1,8); %[-] Fracción masa <np,8>
dens = sum(w.*repmat(rho,np,1),2); %[g/mL] <np,1>

% Calculando el coeficiente de actividad de UNIFAC
x = (c./repmat(MW,np,1))./repmat(sum(c./repmat(MW,np,1),2),1,8); %[-] Fracción molar <np,8>
load UNIFACHexano.mat
gx = gamma(40+273.15,x,'UNIFAC',nu,R,Q,amn); %[-]

% Calculando el coeficiente de actividad a dilución infinita
xinf = zeros(np*7,8); [Ix,Iy] = deal(zeros(np*7,1));
m = 1;
for i = 1:np
for j = 1:7
xi = x(i,:); xi(j) = 0; xinf(7*(i-1)+j,:) = xi/sum(xi);
end
end

ginf = gamma(40+273.15,xinf,'UNIFAC',nu,R,Q,amn); %[-] <np*7,8>
ginf = reshape(ginf(repmat(eye(7,8),np,1) == 1),[np 7]); %[-] <np,7>

%Calculando la actividad corregida
g = rho(8)./repmat(dens,1,7).*1./ ( repmat(MW(1:7),np,1).*...
repmat(sum(w./repmat(MW,np,1),2),1,7) ).*gx(:,1:7)./ginf;
a = [c(:,1:7).*g x(:,end).*gx(:,end)];
[aT,aD,aM,aA] = deal(a(:,1),a(:,2),a(:,3),a(:,4));

% Calculando las velocidades
D = beta(4)*aT.*(1 + beta(5)*aA) + beta(6)*aD.*(1 + beta(7)*aA) + beta(8)*aM.*(1 + beta(9)*aA) +
beta(10)*aA.*(1 + beta(11)*aA);
rT = beta(1)*aT.*aA./D; %[gT/(mL.h)]
rD = beta(2)*aD.*aA./D; %[gD/(mL.h)]
rM = beta(3)*aM.*aA./D; %[gM/(mL.h)]
dcdt = [-rT, 621.0/885.46*rT - rD, 356.54/621.0*rD - rM,...
-46.07/885.47*rT - 46.07/621.0*rD - 46.07/356.54*rM,...
310.53/885.47*rT + 310.53/621.0*rD + 310.53/356.54*rM,...

```

```

92.090/356.54*rM);
dcdt = dcdt(:);

function varargout = gamma(T,x,varargin)
%x puede entrar como una matriz de (np,nc) | (nc,1,np)
%T puede entrar como un valor, un vector con dimension 1, 2 o 3 = np
if length(size(x)) == 3, [nc,oo,np] = size(x);
else [np,nc] = size(x); x = permute(x,[2 3 1]); %<nc,1,np>
end
if all(size(T) ~= np), T = T*ones(1,1,np);
else T = permute(T(:),[2 3 1]);
end

%% Calculo de gamma
switch varargin{1}
case 'NRTL'
    alpha = repmat(varargin{2},[1 1 np]);
    a = repmat(varargin{3},[1 1 np]);
    b = repmat(varargin{4},[1 1 np]);
    c = repmat(varargin{5},[1 1 np]);

    x = repmat(x,[1 nc 1]); %<nc,nc,np>
    T = repmat(T,[nc nc 1]); %<nc,nc,np>
    tau = a + b./T + c.*log(T); %<nc,nc,np>
    G = exp( -alpha.*tau ); %<nc,nc,np>

    ln_g = permute(sum(tau.*G.*x,1)./sum(G.*x,1),[2 1 3]) + sum(permute(x,[2 1 3]).*G.*(tau -
repmat(sum(x.*tau.*G,1)./sum(x.*G,1),[nc 1 1]))./repmat(sum(x.*G,1),[nc 1 1]),2);
    g = exp(ln_g); %<nc,1,np>

case 'UNIFAC'
    nu = repmat(varargin{2},[1 1 np]);
    R = repmat(varargin{3},[nc 1 np]);
    Q = repmat(varargin{4},[nc 1 np]);
    a = repmat(varargin{5},[1 1 np]);
    ngs = size(nu,2);
    Psi = exp(-a./repmat(T,[ngs ngs 1]));

    r = sum( nu.*R,2 ); %<nc,1,np>
    q = sum( nu.*Q,2 ); %<nc,1,np>
    phi = r./repmat(sum(r.*x,1),[nc 1 1]); %<nc,1,np>
    theta = q./repmat(sum(q.*x,1),[nc 1 1]); %<nc,1,np>
    ln_gc = 1 - phi + log(phi) - 5*q.*( 1 - phi./theta + log(phi./theta) ); %<nc,1,np>

    Xk = nu./repmat(sum(nu,2),[1 ngs 1]);
    %<nc,ngs,np>
    Thetak = repmat( permute(Xk.*Q./repmat(sum(Xk.*Q,2),[1 ngs 1]),[1 2 4 3]),[1 1 ngs 1] );
    %<nc,ngs,ngs,np>
    Psik = repmat( permute(Psi,[4 1 2 3]),[nc 1 1 1] );
    %<nc,ngs,ngs,np>
    ln_Gk = Q.*(1 - log( squeeze( sum(Thetak.*Psik,2) ) ) - squeeze(
sum(Thetak.*permute(Psik,[1 3 2 4])./repmat(permute(sum(Thetak.*Psik,2),[1 3 2 4]),[1 1 ngs 1]),2
) ) ); %<nc,ngs,np>
    X = sum(repmat(x,[1 ngs 1]).*nu,1)./repmat( sum(sum(repmat(x,[1 ngs 1]).*nu,1),2),[1 ngs
1] ); %<1,ngs,np>
    Theta = repmat( permute(X.*Q(1,:,:),2),[1 ngs 1]),[2 1 3]), [1
ngs 1]); %<ngs,ngs,np>
    ln_G = Q.*repmat(1 - log(sum(Theta.*Psi,1)) - sum( Theta.*permute(Psi,[2 1 3])./repmat(
permute(sum(Theta.*Psi,1),[2 1 3]), [1 ngs 1]), 1 ),[nc 1 1]); %<nc,ngs,np>
    ln_gr = sum(nu.*(ln_G - ln_Gk),2);
    %<nc,1,np>

    g = exp(ln_gc + ln_gr); %<nc,1,np>

case 'UNIF-DMD'
    nu = repmat(varargin{2},[1 1 np]);
    R = repmat(varargin{3},[nc 1 np]);
    Q = repmat(varargin{4},[nc 1 np]);
    a = repmat(varargin{5},[1 1 np]);
    b = repmat(varargin{6},[1 1 np]);
    c = repmat(varargin{7},[1 1 np]);

```

```

ngs = size(nu,2);
T = repmat(T,[ngs ngs 1]);
Psi = exp(-(a + b.*T + c.*T.^2)./T);

r = sum( nu.*R,2 ); %<nc,1,np>
q = sum( nu.*Q,2 ); %<nc,1,np>
phi = r./repmat(sum(r.*x,1),[nc 1 1]); %<nc,1,np>
phiI = r.^0.75./repmat(sum(r.^0.75.*x,1),[nc 1 1]); %<nc,1,np>
theta = q./repmat(sum(q.*x,1),[nc 1 1]); %<nc,1,np>
ln_gc = 1 - phiI + log(phiI) - 5*q.*( 1 - phi./theta + log(phi./theta) ); %<nc,1,np>

Xk = nu./repmat(sum(nu,2),[1 ngs 1]);
%<nc,ngs,np>
Thetak = repmat( permute(Xk.*Q./repmat(sum(Xk.*Q,2),[1 ngs 1]),[1 2 4 3]),[1 1 ngs 1] );
%<nc,ngs,ngs,np>
Psik = repmat( permute(Psi,[4 1 2 3]),[nc 1 1 1] );
%<nc,ngs,ngs,np>
ln_Gk = Q.*(1 - log( squeeze( sum(Thetak.*Psik,2) ) ) - squeeze(
sum(Thetak.*permute(Psik,[1 3 2 4])./repmat(permute(sum(Thetak.*Psik,2),[1 3 2 4]),[1 1 ngs 1]),2
)) ); %<nc,ngs,np>
X = sum(repmat(x,[1 ngs 1]).*nu,1)./repmat( sum(sum(repmat(x,[1 ngs 1]).*nu,1),2),[1 ngs
1] ); %<1,ngs,np>
Theta = repmat( permute(X.*Q(1, :, :)./repmat(sum(X.*Q(1, :, :),2),[1 ngs 1]),[2 1 3]), [1
ngs 1]); %<ngs,ngs,np>
ln_G = Q.*repmat(1 - log(sum(Theta.*Psi,1)) - sum( Theta.*permute(Psi,[2 1 3])./repmat(
permute(sum(Theta.*Psi,1),[2 1 3]), [1 ngs 1]), 1) ,[nc 1 1]); %<nc,ngs,np>
ln_gr = sum(nu.*(ln_G - ln_Gk),2);
%<nc,1,np>

g = exp(ln_gc + ln_gr); %<nc,1,np>

case 'UNIF-LBY'
nu = repmat(varargin{2},[1 1 np]);
R = repmat(varargin{3},[nc 1 np]);
zQ2 = repmat(varargin{4},[nc 1 np]);
a1 = repmat(varargin{5},[1 1 np]);
a2 = repmat(varargin{6},[1 1 np]);
a3 = repmat(varargin{7},[1 1 np]);
ngs = size(nu,2);
T = repmat(T,[ngs ngs 1]);
Psi = exp(-( a1 + a2.*(T - 298.15) + a3.*(T.*log(298.15./T) + (T - 298.15)) )./T);

r = sum( nu.*R,2 ); %<nc,1,np>
phi = r.^(2/3)./repmat(sum(r.^(2/3).*x,1),[nc 1 1]); %<nc,1,np>
ln_gc = 1 - phi + log(phi); %<nc,1,np>

Xk = nu./repmat(sum(nu,2),[1 ngs 1]);
%<nc,ngs,np>
Thetak = repmat( permute(Xk.*zQ2./repmat(sum(Xk.*zQ2,2),[1 ngs 1]),[1 2 4 3]),[1 1 ngs 1]
); %<nc,ngs,ngs,np>
Psik = repmat( permute(Psi,[4 1 2 3]),[nc 1 1 1] );
%<nc,ngs,ngs,np>
ln_Gk = zQ2.*(1 - log( squeeze( sum(Thetak.*Psik,2) ) ) - squeeze(
sum(Thetak.*permute(Psik,[1 3 2 4])./repmat(permute(sum(Thetak.*Psik,2),[1 3 2 4]),[1 1 ngs 1]),2
)) ); %<nc,ngs,np>
X = sum(repmat(x,[1 ngs 1]).*nu,1)./repmat( sum(sum(repmat(x,[1 ngs 1]).*nu,1),2),[1 ngs
1] ); %<1,ngs,np>
Theta = repmat( permute(X.*zQ2(1, :, :)./repmat(sum(X.*zQ2(1, :, :),2),[1 ngs 1]),[2 1 3]),
[1 ngs 1]); %<ngs,ngs,np>
ln_G = zQ2.*repmat(1 - log(sum(Theta.*Psi,1)) - sum( Theta.*permute(Psi,[2 1 3])./repmat(
permute(sum(Theta.*Psi,1),[2 1 3]), [1 ngs 1]), 1) ,[nc 1 1]); %<nc,ngs,np>
ln_gr = sum(nu.*(ln_G - ln_Gk),2);
%<nc,1,np>

g = exp(ln_gc + ln_gr); %<nc,1,np>
end

if ~exist('oo','var'), g = squeeze(permute(g,[3 1 2])); end
varargout{1} = g;

```

ANEXO II. GRÁFICAS DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA REACCIÓN

A continuación se presentan las figuras correspondientes a los resultados del diseño experimental mostrado en la Tabla 17 para las corridas con n - hexano como solvente. Los datos experimentales se muestran mediante marcadores como sigue: (▼) Triglicéridos, (■) diglicéridos, (●) monoglicéridos y (◆) biodiesel. Las predicciones del modelo se trazaron mediante líneas de diferentes tipos: (-) Triglicéridos, (--) diglicéridos, (-.) monoglicéridos y (-.-) biodiesel.

